

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 38/00		A2	(11) International Publication Number: WO 98/33509
			(43) International Publication Date: 6 August 1998 (06.08.98)
(21) International Application Number: PCT/IB98/00441		(74) Agent: BIZLEY, Richard, Edward; Hepworth Lawrence Bryer & Bizley, Merlin House, Falconry Court, Baker's Lane, Epping, Essex CM16 5DQ (GB).	
(22) International Filing Date: 2 February 1998 (02.02.98)			
(30) Priority Data: 60/036,859 3 February 1997 (03.02.97) US 09/017,043 2 February 1998 (02.02.98) US		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(63) Related by Continuation (CON) or Continuation-in-Part (CIP) to Earlier Application US Not furnished (CON) Filed on 2 February 1998 (02.02.98)		Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>	
(71) Applicant (for all designated States except US): PHARMING B.V. [NL/NL]; Niels Bohrweg 11-13, NL-2333 CA Leiden (NL).			
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): NUIJENS, Jan [NL/NL]; Zevenhuizerlaan 42, NL-1851 MV Heiloo (NL). VAN BERKEL, Patrick, H., C. [NL/NL]; Rodenrijserweg 315, NL-2651 BS Berkel en Rodenrijs (NL).			
(54) Title: USEFUL PROPERTIES OF HUMAN LACTOFERRIN AND VARIANTS THEREOF			
(57) Abstract			
<p>The invention provides compositions containing human lactoferrin, or lactoferrin variants deleted for one or more arginine residues in the amino-terminal region of the protein (i.e., in the first basic cluster), and methods of using the compositions. The human lactoferrin, or lactoferrin variants, are useful for treatment of human diseases and conditions, including inflammation.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-515893

(P2002-515893A)

(43) 公表日 平成14年5月28日 (2002.5.28)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 K 38/16		A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/00		7/06	
7/06		9/10	
9/10		29/00	
29/00		31/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 79 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平10-532679	(71) 出願人	ファーミング インテレクチュアル プロ パティ ビービー
(86) (22) 出願日	平成10年2月2日 (1998.2.2)		オランダ国 エヌエル-2333 シーエイ
(85) 翻訳文提出日	平成11年8月3日 (1999.8.3)		ライデン, ニールズ ボーウェグ 11-13
(86) 国際出願番号	P C T / I B 9 8 / 0 0 4 4 1	(72) 発明者	ニュージェンズ, ジャン
(87) 国際公開番号	W O 9 8 / 3 3 5 0 9		オランダ国 エヌエル-1851 エムプイ
(87) 国際公開日	平成10年8月6日 (1998.8.6)		ハイロー, ゼベンフイザーラン 42
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 3 6 , 8 5 9	(72) 発明者	バン バークル, バトリック エイチ. シー.
(32) 優先日	平成9年2月3日 (1997.2.3)		オランダ国 エヌエル-2651 ビーエス
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		バークル エン ロデンリス, ロデンリザ
(31) 優先権主張番号	0 9 / 0 1 7 , 0 4 3		ーウェグ 315
(32) 優先日	平成10年2月2日 (1998.2.2)	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトラクトフェリンおよびその改変体の有用な特性

(57) 【要約】

本発明は、ヒトラクトフェリン、またはタンパク質のアミノ末端領域で（すなわち、第1の塩基性クラスターで）1つ以上のアルギニン残基を欠くラクトフェリン改変体を含む組成物、およびこの組成物を使用する方法を提供する。ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体は、炎症を含む、ヒトの疾患および症状の処置に有用である。

【特許請求の範囲】

1. ヒトラクトフェリン改変体を含む薬学的組成物であって、該組成物が、他のヒトタンパク質を実質的に含まず、そして該ラクトフェリン改変体が、天然ラクトフェリンよりも低い親和性でヘパリンを結合する、組成物。
2. 前記ヒトラクトフェリン改変体が、hLF¹⁻¹¹、hLF¹⁻¹²、hLF¹⁻¹³、またはhLF¹⁻¹⁴である、請求項1に記載の組成物。
3. ウシ乳汁タンパク質をさらに含む、請求項2に記載の組成物。
4. 前記ヒトラクトフェリン改変体が、鉄で約3%と約100%との間に飽和される、請求項1に記載の組成物。
5. 前記ヒトラクトフェリン改変体が、鉄で少なくとも約95%飽和される、請求項4に記載の組成物。
6. 請求項1に記載の組成物を投与する工程を包含する、患者においてラクトフェリンレセプターを活性化する方法。
7. 前記ラクトフェリンレセプターが、105kDラクトフェリンレセプターである、請求項6に記載の方法。
8. 前記105kDレセプターが、Jurkat細胞ラクトフェリンレセプターである、請求項7に記載の方法。
9. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者においてラクトフェリンレセプター保有細胞からのサイトカインの放出を減少させる方法。
10. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項9に記載の方法。
11. 前記サイトカインが、IL-1、IL-2、またはTNF α である、請求項9に記載の方法。
12. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者において骨髓造血を阻害する方法。
13. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項12に記載の方法。

14. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者においてTNF α 媒介好中球脱顆粒を減少させる方法。

15. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項14に記載の方法。

16. 患者においてラクトフェリンレセプター保有細胞に鉄を送達する方法であって、ヒトラクトフェリンを含む組成物を該患者に投与する工程を包含し、ここで、該ヒトラクトフェリンが、鉄で少なくとも約95%飽和される、方法。

17. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項16に記載の方法。

18. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者において慢性炎症性腸疾患を処置する方法。

19. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項18に記載の方法。

20. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者において貧血または鉄蓄積疾患を処置する方法。

21. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項20に記載の方法。

22. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者において炎症を減少させる方法。

23. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項22に記載の方法。

24. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、患者において固形腫瘍の増殖を阻害する方法。

25. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項24に記載の方法。

26. 請求項1に記載の組成物を患者に投与する工程を包含する、患者においてナチュラルキラー（NK）細胞を刺激する方法。

27. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物であ

る、請求項26に記載の方法。

28. ヒトラクトフェリンを含む組成物を患者に投与する工程を包含する、心筋梗塞後の患者において再灌流障害を減少させる方法。

29. ヒトラクトフェリンを含む前記組成物が、請求項1に記載の組成物である、請求項28に記載の方法。

30. ヒトラクトフェリンを含む組成物であって、該ラクトフェリンの第1の塩基性クラスターが中和され、そしてラクトフェリン改変体が、天然ラクトフェリンよりも高い親和性でJurkat細胞105kDラクトフェリンレセプターを結合する、組成物。

31. 前記ラクトフェリンが、抗ラクトフェリンモノクローナル抗体によって中和される、請求項30に記載の組成物。

32. 前記ラクトフェリンが、ヘパリンへの結合によって中和される、請求項30に記載の組成物。

33. ヒトラクトフェリン改変体を含む薬学的組成物であって、該ラクトフェリンが、第1の塩基性クラスターを含むが第2の塩基性クラスターを含まない、組成物。

34. 細胞表面プロテオグリカンへの結合によって細胞に侵入するウイルスの細胞への侵入を阻害する方法であって、ヒトラクトフェリンを含む組成物に該細胞を曝露する工程を包含し、該ヒトラクトフェリンが細胞表面プロテオグリカンに結合し、そして細胞表面プロテオグリカンへの結合によって該細胞に侵入するウイルスの該細胞への侵入が阻害される、方法。

35. 前記ウイルスが、CMV、HSV1、またはHIVである、請求項34に記載の方法。

36. 細胞表面プロテオグリカンへの結合によって細胞に侵入するウイルスの該細胞への侵入を阻害する方法であって、請求項2に記載の組成物に該細胞を曝露する工程を包含し、ヒトラクトフェリン改変体が、細胞表面プロテオグリカンに結合し、そして細胞表面プロテオグリカンへの結合によって該細胞に侵入する

ウイルスの該細胞への侵入が阻害される、方法。

37. 前記ウイルスが、CMV、HSV1、またはHIVである、請求項36に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

ヒトラクトフェリンおよびその改変体の有用な特性

発明の背景

ラクトフェリン (LF) は、乳汁、涙、唾液、気管支分泌物、腸分泌物、膺分泌物、および他の分泌物に見られるM_r77,000の金属結合糖タンパク質である。LFはまた、好中球の二次顆粒に存在する。ラクトフェリンは、単球コロニー刺激因子合成の調節、インターロイキン合成の調節、ナチュラルキラー細胞活性の活性化、転移の阻害、およびT細胞の成熟のような、多くの炎症および免疫応答機能に重要な役割を果たす。

LFのアミノ酸配列は、タンパク質配列決定およびcDNAクローンの配列決定によって決定されている。ヒトLF (hLF) は、692アミノ酸のポリペプチド鎖からなる。hLFのアミノ末端領域は、塩基性残基の2つのクラスター、RRRR (残基2～5) およびRNMRKVR (残基25～31) を含む。LFポリペプチドは、2つの球状ローブ (lobe) に折り畳まれ、そのそれぞれは鉄結合クレフトを含む。LFの鉄に対する高い親和性は、タンパク質に特定の抗菌特性を与え、そしてさらに、小腸による規定の鉄の吸収において役割を果たし得る。

LFの生物学的活性化のいくつかは、鉄の結合からではなく、他の分子に結合する能力から生じる。hLFとヒトリゾチーム (hLZ) との間の直接的分子間相互作用は、これらの2つのタンパク質の抗菌作用間の相乗作用を説明し得る。リポ多糖 (LPS) およびポーリンのような細菌外膜成分とhLFとの相互作用は、おそらく、hLFの抗菌活性に重要な役割を果たす。LPSのリビドA部分へのhLFの結合は、増強されたfMLPがきっかけとなるスーパーオキシド放出についての好中球のLPSブライミングを阻害する。LFのヘパリンとの相互作用は、ヘパリンの抗凝固活性の中和を説明し得る。

LFのいくつかの生物学的活性は、膜結合したレセプターによるLFと細胞との間の相互作用を生じる。例えば、単球、マクロファージ、および活性化したリンパ球の特異的レセプターへのLF結合は、サイトカイン産生の阻害を生じる。hLFへ

の特異的結合を示す細胞には、肝細胞、腸細胞、乳腺上皮細胞、単球細胞株、活

性化したリンパ球、および血小板が挙げられる。

発明の簡単な要旨

本発明は、ヒトラクトフェリン、またはタンパク質のアミノ末端領域における（すなわち、第1の塩基性クラスターにおける）1つ以上のアルギニン残基を欠失したラクトフェリン改変体を含む組成物、および組成物の使用を提供する。1つの局面では、本発明は、第1の塩基性クラスターにおける1つ以上のアルギニン残基を欠失したヒトラクトフェリン改変体を含む組成物である。本発明は、特に、ヒトラクトフェリン改変体hLF¹⁻¹、hLF¹⁻²、hLF¹⁻³、およびhLF¹⁻⁴に関する。これらの改変体のこれらの結合特性は、有利な点で、天然ラクトフェリンの特性とは異なる。1つの局面では、組成物は、必要に応じてウシ乳汁を含む、薬学的組成物である。いくつかの実施態様では、ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体は、鉄で飽和され、代表的には少なくとも95%飽和される。

本発明はまた、ヒトラクトフェリンおよびラクトフェリンアルギニン欠失改変体の使用に関する。1つの局面では、本発明は、hLFまたはhLF改変体を投与することによって、ラクトフェリンレセプター、例えば、105kdラクトフェリンレセプターを活性化する方法を提供する。

他の局面では、本発明は、ラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体を投与することによって、患者においてラクトフェリンレセプター保有細胞から、IL-1、IL-2、またはTNF α のようなサイトカインの放出を減少または阻害する方法を提供する。

他の局面では、本発明は、ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体が、慢性炎症性腸疾患の処置のために骨髓造血を阻害するために、または患者においてTNF α 媒介好中球脱顆粒を減少させるために、患者に投与される方法を提供する。

他の局面では、本発明は、鉄で少なくとも約95%飽和されるヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体の組成物を患者に投与することによって、患者においてラクトフェリンレセプター保有細胞に鉄を送達する方法を提供する。これ

らの化合物の投与は、例えば、貧血または鉄蓄積疾患(iron storage disease)の

処置に有益である。

他の局面では、本発明は、ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体が、炎症を減少させるために患者に投与される方法を提供する。hLFおよびhLF改変体の投与は、心筋梗塞後の患者における再灌流障害を減少させるために有用である。

他の局面では、本発明は、ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体が、患者において固形腫瘍の増殖を阻害するために、および患者においてナチュラルキラー（NK）細胞を刺激するために、患者に投与される方法を提供する。

本発明はまた、ウイルス侵入が、ウイルスと細胞表面プロテオグリカンとの間の相互作用によって媒介される、ウイルス、例えば、CMV、HIV、またはHSV1ウイルスの細胞への侵入を阻害するための方法を提供する。

関連する局面では、本発明は、ラクトフェリンの第1の塩基性クラスターが、例えば、抗ラクトフェリンモノクローナル抗体またはヘパリンの結合によって中和され、そのためラクトフェリンが、天然のラクトフェリンよりも高い親和性でJurkat細胞105kDラクトフェリンレセプターを結合する、ヒトラクトフェリンを含む組成物である。

他の局面では、本発明は、第1の塩基性クラスターを含むが、第2の塩基性クラスターを含まない、ラクトフェリン改変体を含む薬学的組成物を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、固相ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAへのhLFの結合を示す。精製した天然hLF（50ng/ml）の連続希釈を、記載のようにマイクロタイタープレートにコーティングされたヘパリン（●）、リピドA（×）、hLZ（□）、およびdsDNA（■）とともにインキュベートした。結合したhLFを、ペルオキシダーゼ標識したウシ抗hLFとの続いてのインキュベーションによって検出した。基質変換を硫酸で停止した後に測定したA₄₉₂値を、縦軸に示す。ウェル中のhLF濃度を、横軸に示す。

図2は、LPSおよびhLZへのhLFの結合におけるNaCl濃度の影響を示す。Salmonella minnesota Re595（●）またはhLZ（○）由来のLPSが固定される等量のSepharose

を、0.02% (w/v) Tween-20および種々の濃度のNaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.6に懸濁した。Sephacroseビーズを、ヘッドオーバーヘッドローテーションによって 125 I-hLFとともにインキュベートした。16時間後、ビーズを10mMリン酸ナトリウム、0.02% Tween-20で洗浄し、そして結合した放射能を測定した。結果を、添加した 125 I-hLFの総量の結合割合として表した。Sephacrose懸濁液のNaCl濃度を横軸に示す。

図3は、ヘパリン、リピドA、およびhLZに結合するhLFの抗hLF mAb E11による競合阻害を示す。プレートに、ヘパリン（左）、リピドA（中）、およびhLZ（右）でコーティングした。ビオチン化hLFを、記載のように抗hLF mAb E11(□)、抗hLF mAb E3(■)、およびコントロールmAb (●)の連続希釈とともにプレインキュベートした。競合物の存在で結合する残りのhLF（競合物なしでのhLFに関して；100%）を、縦軸に示す。ウェル中のmAb濃度（nM）を横軸に示す。

図4は、抗hLF mAbへの組換えN-およびC-ローブならびに天然hLFの結合を示す。天然hLF（100ng/ml、□）およびrN-ローブ（○）またはrC-ローブ（△）を分泌する293(S)細胞の馴化培地の連続希釈を、記載のようにマイクロタイタープレートにコーティングされた精製したmAb E11(A)；E3(B)およびE19(C)とともにインキュベートした。結合したhLFを、ペルオキシダーゼ結合抗hLFとの続いてのインキュベーションによって検出した。基質変換を硫酸で停止した後に測定したA₄₉₂値を、縦軸に示す。試験した実験容量（μl）を、横軸に示す。

図5は、抗hLF mAb E11およびE3へのN末端欠失したおよび天然のhLFの結合の比較を示す。天然hLF（40μg/ml、■）、hLF¹⁻¹¹（20μg/ml、□）、hLF¹⁻¹¹（10μg/ml、●）、およびrhLF¹⁻¹¹（7μg/ml、○）の連続希釈を、SephacroseにカップリングしたmAb E11(A)またはE3(B)とともにインキュベートした。結合したhLFを、ポリクローナル 125 I-抗hLF抗体との続いてのインキュベーションによって検出した。結果を、添加した抗体の総量の結合の割合として表した。

図6は、限定してタンパク質分解されたhLfのMono Sクロマトグラフィー後に得られる精製したN末端欠失したhLfの非還元SDS-PAGE分析を示す。0.5および0.6 NaClでMono Sから溶出された限定してタンパク質分解されたhLfを含む画分を、非還元サンプル緩衝液で希釈し、そして5分間煮沸した後にSDS-PAGE（12.5%

w/

v) にアプライした [van Berkelら, 1995, Biochem. J., 312, 107-114]。天然 hLf (レーン 1)、および 1 分切断物 (レーン 2 および 3) から、5 分切断物 (レーン 4 および 5) から、25 分切断物 (レーン 6 および 7) から、および 180 分切断物 (レーン 8 および 9) から単離された hLf¹¹ および hLf¹² のサンプル。すべてのレーンは、5 μ g のタンパク質を含む。右の数字 ($10^{-1} \times \text{Mr}$) は、タンパク質スタンダードの移動度を示す。サンプルの還元 SDS-PAGE 分析で同様の結果を得た (データを示さず)。

図 7 は、濃度の関数として、Jurkat 細胞への N 末端欠失した hLf 改変体の結合を示す。曲線は、hLf (●); rhLf (○); hLf¹¹ (■); hLf¹² (□); hLf¹³ (◇); および rhLf¹⁴ (◆) の特異的結合に対応する。値は、二連での 2 ~ 3 の別々の実験の平均である。

図 8 は、Jurkat 細胞への N 末端欠失した hLf 改変体の結合パラメータを示す。hLf (1); rhLf (2); hLf¹¹ (3); hLf¹² (4); hLf¹³ (5); および rhLf¹⁴ (6) の解離定数 (a) および細胞当たりの結合部位の数 (b)。値は、二連での 2 ~ 3 の別々の実験の平均 ($\pm \text{S.E.M.}$) である。

図 9 は、濃度の関数として Jurkat 細胞への hLf、bLf、および mLf の結合を示す。曲線は、細胞への hLf (●); bLf (○); および mLf (□) の特異的結合に対応する。値は、二連での 2 ~ 3 の別々の実験の平均である。

図 10 は、Jurkat 細胞への hLf、bLf、および mLf の結合パラメータを示す。hLf (1)、bLf (2)、および mLf (3) の解離定数 (a) および細胞当たりの結合部位の数 (b)。値は、二連での 2 ~ 3 の別々の実験の平均 ($\pm \text{S.E.M.}$) である。

図 11 は、天然 hLf および N 末端欠失した hLf 改変体の結合に対する Jurkat 細胞の塩素酸ナトリウム処理の効果を示す。曲線は、塩素酸ナトリウムの非存在下で培養した Jurkat 細胞への hLf (●) の特異的結合、および 30mM 塩素酸ナトリウムの存在下で 24 時間培養した Jurkat 細胞への hLf (○); hLf¹¹ (■); rhLf¹² (□) の特異的結合に対応する (方法を参照のこと)。値は、二連での 2 ~ 3 の別々の実験の平均である。

図12は、30mM塩素酸ナトリウムの存在または非存在下で培養したJurkat細胞への天然hLfおよびN末端欠失したhLf改変体の結合パラメータを示す。塩素酸ナトリウムの非存在下で培養した細胞におけるhLf(1)の、および24時間塩素酸ナトリウムの存在下で培養した細胞におけるhLf(2); hLf¹⁻¹¹(3); rhLf¹⁻¹¹(4)の、解離定数(a)および細胞当たりの結合部位の数(b)。値は、二連での2~3の別々の実験の平均(±S.E.M.)である。

図13は、塩基性残基の分布を示すhLf、bLf、およびmLfのN末端アミノ酸配列アラインメントを示す。hLf [Metz-Boutigueら, 1984, Eur. J. Biochem. 145, 659-676; Reyら, 1990, Nucleic Acids Res. 18, 5288] と、bLf [Pierceら, 1991, Eur. J. Biochem. 196, 177-184] と、mLf [Pentecostら, 1987, J. Biol. Chem. 262, 10134-10139] との間の同一アミノ酸を四角で囲む。ArgおよびLys残基に、それぞれ黒および灰色で下線を引く。配列の番号付けは、Metz-Boutigueら, 前出による。

図14は、全血培養物中の種々のラクトフェリン種によるヘパリンの中和を示す。種々の濃度でヘパリンを、100μg/mlラクトフェリンの存在または非存在下で希釈した全血に添加した。2時間後、上清中のTAT複合体の量を、ELISAによって決定した。

図15は、種々のGAGによる全血培養物の抗凝固ならびにラクトフェリンおよび硫酸プロタミンによる中和を示す。種々の濃度のヘパリン、エノキサパリン(eno xaparine)、硫酸ヘパラン、またはNアセチルヘパリンを、非存在(○)または100μg/ml hLF(■)、bLF(□)、もしくは2μg/ml硫酸プロタミン(●)の存在下で、希釈した全血に添加した。2時間後、上清中のTAT複合体の量を、ELISAによって決定した。

図16は、HT-29細胞への天然hLFの特異的結合を示す。値は、二連の実験の平均である。挿入図は、データのスキッチャード分析を示す。

図17は、HT-29細胞への天然hLFの特異的高親和性結合を示す。値は、二連の実験の平均である。挿入図は、データのスキッチャード分析を示す。

図18は、HT-29細胞へのhLFの結合の阻害を示す。ヒトラクトフェリンを、mAbE

11の漸増濃度の存在下で1時間ブレインキュベートした。

詳細な説明

I. 序論

本発明は、天然LFの生物学的活性、例えば、細胞上の高親和性LFレセプターへの結合を有するが、天然LFに対して、ヘパリン、DNA、ヒトリソチーム、細菌リポ多糖（LPS）のリピドA成分、および硫酸化細胞表面分子への減少した結合を有する、ラクトフェリン改変体を提供する。特に、本発明は、第1の塩基性クラスター（すなわち、残基2～5）からの1～4アルギニン残基が欠失されているラクトフェリンの改変体を提供する。

本発明はまた、ヒトおよび他の動物における特定の疾患および症状の緩和のための、hLFおよびLF改変体を使用する方法を提供する。本明細書に開示されるように、ヒトラクトフェリンは、例えば、炎症、貧血、骨髓造血の処置のために、および再灌流障害、サイトカイン放出、および細胞へのウイルスのプロテオグリカン媒介侵入を減少させるために、有用である。ラクトフェリン改変体はまた、これらの疾患および症状の処置に有用であり、そして、天然ラクトフェリン処置の有益な効果が高親和性LFレセプターへの結合によるものであるその症状の処置に特に有用である。さらに、LF改変体の使用に対する有利点は、所望の生理学的効果が達成され得るが、ヘパリン、DNA、ヒトリソチーム、リピドA、または細胞表面プロテオグリカンへの天然LFの結合によって引き起こされる副作用を避けることである。例えば、本発明のラクトフェリン改変体は、ヘパリンの同時中和および類似の効果なしに、細胞へ栄養性鉄を送達するために使用され得る。LF改変体が硫酸化した細胞表面分子にほとんどまたは全く結合せず、そして高親和性LFレセプターへの増加した親和性で結合するので、これらのレセプターへのLFのより効率的標的化が達成され得る。

II. 定義

天然ラクトフェリン

本明細書で使用される場合、「天然ラクトフェリン」とは、4つの連続するアルギニン残基のN末端クラスターを含む全長ヒトラクトフェリンポリペプチド、

例えば、実質的にMetz-Boutigueら⁵, 1984, Eur. J. Biochem. 659:1451に記載のようなアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、PCT公開W091/08216および他

の刊行されたタンパク質およびDNA配列で同定された配列不一致を示す。用語天然ラクトフェリンはまた、第1の塩基性クラスター（すなわち、アミノ末端残基2～5）における欠失および／または第2の塩基性クラスター（すなわち、残基25～31）における欠失のある任意の改変体が、天然ラクトフェリンではないこと以外は、天然に存在するヒトラクトフェリンと比較して、1つ以上のアミノ酸の挿入、置換、または欠失によって改変されている天然に存在するヒト対立遺伝子変異体およびアミノ酸配列改変体を含む。

天然ラクトフェリンは、ウシのようなトランスジェニック非ヒト動物で発現される組換えコードされたヒトラクトフェリン（「rhLF」）を含み、ここで、グリコシル化パターンは、ヒト乳汁から得られる天然に存在するヒトラクトフェリンのグリコシル化パターンとは異なり得る。

ラクトフェリン改変体

本明細書に記載のラクトフェリン改変体は、アミノ末端での1、2、3、または4アルギニン残基が除去されている（すなわち、第1の塩基性クラスターのすべてまたは一部の欠失）か、または第2の塩基性クラスターの残基が除去されているか、または第1および第2の両方の塩基性クラスターが除去されている、天然ラクトフェリンの配列を有するポリペプチドを含む。第1の塩基性クラスターのアルギニン残基は、天然ラクトフェリンのタンパク質分解によって、または短縮型hLFをコードするポリペプチドの発現によって、除去され得る。あるいは、第1の塩基性クラスターの1つ以上のアルギニン残基は、他の（すなわち、アルギニン以外）アミノ酸によって、例えば、hLFをコードするポリヌクレオチドの特異的(directed)変異誘発によって、置換され得る。好ましい実施態様では、第1の塩基性クラスターの1つ以上のアルギニン残基は、欠失されるか、あるいは、生理学的pHで正荷電していないアミノ酸、すなわち、中性または酸性残基に、通常は中性アミノ酸に、より頻繁にはアラニン、ロイシン、グリシン、バリン、またはイソロイシンに変異される。以下、第1の塩基性クラスターのすべてまた

はいくつかのアルギニン残基が「欠失」または「除去」されているhLF改変体についての言及は、他に明確に述べられなければ、両方とも、欠失によるまたは変異

誘発による第1の塩基性クラスターのアルギニンの除去をいう。

hLFのアミノ末端配列は、N'-GRRRSVQWCである。本発明のラクトフェリン改変体には、1つのアルギニン（末端グリシンとともに）残基の欠失を有する改変体（hLF^{Δ1}という）、除去された2つのアルギニン残基を有する改変体（hLF^{Δ2}という）、除去された3つのアルギニン残基を有する改変体（hLF^{Δ3}という）、および除去された4つのすべてのアルギニン残基を有する改変体（hLF^{Δ4}という）が含まれる。

他のラクトフェリン改変体は、第2の塩基性クラスターの残基が欠失または（例えば、非荷電残基に）変異されているhLFである。本発明のさらに他のラクトフェリン改変体は、第2の塩基性クラスターの欠失および1つ以上のアミノ末端アルギニン残基の欠失を有する。

中和されたラクトフェリン

本明細書で使用される、「中和されたラクトフェリン」は、第1の塩基性クラスターの残基の改変によって、天然のヒトラクトフェリンと同様に、以下の実施例Iに記載される固相リガンド結合アッセイによって測定されるように、LFリガンド（例えば、ヘパリン）に結合し得ないが、以下の実施例IIに記載の細胞結合アッセイによって測定されるように、Jurkatヒトリンパ芽球T細胞で見られる105kdラクトフェリンレセプターを結合する（Biら, 1994, Eur. J. Cell Biol. 65, 164-171およびBiら, 1996, Eur. J. Cell Biol. 69, 288-296）、天然のラクトフェリンの配列を実質的に有するラクトフェリンである。「改変」には、第1の塩基性クラスターの残基の化学的改変、あるいは、ラクトフェリンおよびヘパリンの第1の塩基性クラスターの相互作用をブロックする（すなわち、立体障害によって）分子の結合が含まれる。ブロッキング分子には、モノクローナル抗体、そのフラグメント、およびヒトリソチームまたはヘパリンのようなLFリガンドが含まれる。

実質的に含まない

LF改変体組成物は、サンプルに存在するヒトタンパク質の少なくとも約90%、

より通常には少なくとも約95%、および最も普通には少なくとも約99%が、LF改変体である場合、他のヒトタンパク質（天然hLFを含む）を実質的に含まない。

サンプルに存在する任意の特異的タンパク質の量は、（比較的単純な混合物については）定量的SDS-PAGEによって、またはより複雑な混合物（例えば、ウシ乳汁タンパク質とLF改変体との混合物）については免疫学的アッセイ（例えば、ELISAおよびRIA）によって、決定され得る。

免疫学的小および分子生物学的方法は周知であり、そして、例えば、Sambrookら, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989ならびにHarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring harbor, New York(1988)に記載され、その両方とも、その全体がおよびすべての目的で参考として本明細書に援用される。

実質的に純粋

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋」とは、目的の種が存在する優性な種である（すなわち、モルベースでは、組成物中の任意の他の個々の種よりも豊富である）ことを意味し、そして好ましくは、実質的に精製された画分は、目的の種が、存在するすべての巨大分子種の少なくとも約50パーセント（モルベースで）を含む組成物である。一般的に、実質的に純粋な組成物は、組成物に存在するすべての巨大分子種の約80~90パーセントより多くを含む。最も好ましくは、目的の種は、本質的に均一（夾雑種は、従来の検出方法によって組成物中から検出され得ない）まで精製され、ここで組成物は、単一の巨大分子種から本質的になる。

III. ラクトフェリンおよびラクトフェリン改変体の産生

1つ以上のアミノ末端アルギニン残基を欠くLF改変体は、種々の方法によって産生され得る。産生の好ましい方法には、(1)天然LFのタンパク質分解切断、または(2)組換え発現、例えば、LF遺伝子の変異誘発、次いでLF改変体の細胞また

はトランスジェニック動物での発現が挙げられ、組換え発現が最も好ましい。第

2の塩基性クラスターの残基の欠失は、好ましくは、インビトロ変異誘発によって行われる。

A. LFの精製および続いてのタンパク質分解切断

LF改変体は、プロテアーゼ、好ましくはセリンプロテアーゼ、および最も好ましくはトリプシンでの、精製されたラクトフェリンの切断によって産生され得る。LFは、乳汁中に豊富であり、そしてこの供給源から最も容易に精製されるが、外分泌および好中球の二次顆粒でも見られる。hLFの好ましい供給源は、ヒトラクトフェリントランスジーンを含むトランスジェニックウシ種からの乳汁である。トランスジーンコードされたヒトラクトフェリンは、トランスジェニックウシの乳汁中の他の乳汁タンパク質から実質的に精製され、そして好ましくは、乳汁中に存在するならば、内因性ウシラクトフェリンから実質的に単離される。

乳汁からのヒトラクトフェリンの精製のための多くの方法が報告されている。例えば、米国特許第4,436,658号；第4,791,193号；および第4,668,771号を参照のこと。これらは、参考として本明細書に援用される。Nuijensら, J., 1996, *Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1:3, 283-293(1996)およびそれに引用される参考文献もまた参照のこと。

hLF精製に好ましい方法は、PCT出願PCT/EP95/00583に記載され、これは参考として本明細書に援用される。簡単にいえば、乳汁またはhLFを含む乳汁画分は、比較的高いイオン強度（0.2M～0.5M NaClまたはKCl、好ましくは0.4M NaClまたはKCl）の存在下で強陽イオン交換樹脂（例えば、S Sepharose[®]）と接触されて、強陽イオン交換樹脂への非ラクトフェリントタンパク質および他の物質の結合を抑制し、そして他のタンパク質（例えば、カゼイン）または物質（例えば、リボ多糖）とラクトフェリンとの静電的相互作用を減少させ、そして複合体からラクトフェリンを遊離させる。結合したラクトフェリンを含む強陽イオン交換樹脂は、代表的には、遠心分離または沈降、次いでバッチ式での洗浄によって、および/またはカラムに樹脂を注ぎそしてほぼ等しいかまたはより低い塩濃度を有する緩衝液でビーズを洗浄することによって、乳汁または乳汁画分中の非結合化合物

から分離される。陽イオン交換樹脂に結合したラクトフェリンは、水性、代表

的には緩衝化された、NaClまたはKCl勾配（例えば、20mMリン酸ナトリウム、pH7.5中0～1M NaClの直線勾配）で、あるいは0.4M以上、好ましくは少なくとも0.5M NaClまたはKClの水性、好ましくは緩衝化された、NaClまたはKCl溶液で、バッチ溶出または段階的溶出によって、溶出される。適切な溶出条件を選択することによって、ヒトラクトフェリンは、ウシ乳汁から実質的に精製され、そして効率的な方法によってウシラクトフェリンから実質的に分離される。

ヒトラクトフェリン（例えば、rhLF）は、塩勾配または段階的溶出で、S Sepharose[®] Fast Flowのような強陽イオン交換体での再クロマトグラフィーのさらに続いたの工程によって内因性ラクトフェリン（例えば、bLF）からさらに精製され得、内因性非ヒトラクトフェリン種（例えば、bLF）の軌跡を維持することから、ヒトラクトフェリンを分離するか、および／またはbLFは、hLFよりもConA樹脂により強力に結合しているので、bLFからヒトラクトフェリンをさらに分離するためにコンカナバリンA樹脂でのアフィニティークロマトグラフィーを必要に応じて含み得る。

精製された天然ラクトフェリンのトリプシン切断は、以下のように行われ得る：5ミリグラムの天然hLFを、PBS中37℃にて1:8の酵素：基質モル比でトリプシンとインキュベートする。切断を、12倍モル過剰のSBTIの添加によって1、5、25分、および3時間後に停止し、そしてN末端完全性を、例えば、分析用Mono Sクロマトグラフィー（Van Berkelら、1995、Biochem. J. 312:107-114）ならびにSDS-PAGE、クロマトグラフィー、およびタンパク質配列決定のような標準的技法によって、モニターする。

タンパク質分解の後、LF改変体は、互いからおよび天然の（すなわち、切断されていない）hLF（および、存在するならば他のタンパク質）から、陽イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Mono S；ヘパリン）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、またはCibacron Blue Sepharoseクロマトグラフィーによって分離され得る。1つの実施態様では、LF改変体は、組換え発現されたラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体およびS Sepharoseの4時間のバッチ式イン

キュベーションによって、切断されていないLF（および互いに）から分離される。混合物を、カラムに注ぎ、そしてラクトフェリンを、20mMリン酸ナトリウム、0,

5M NaCl、pH7.5で溶出する。S Sepharose溶出物を、20mMリン酸ナトリウム、pH7.5（緩衝液A）で希釈し、Mono S HR 5/5陽イオン交換カラムにアプライし、そして60mlの緩衝液A中0～0.5M NaClの直線塩勾配で0.5ml/分の流速で溶出する。天然hLF溶出物は0.7M NaClで（Van Berkelら、1995, Biochem. J. 312:107-114）そしてhLF¹溶出物は約0.33M NaClで溶出する。hLF¹およびhLF²種は、それぞれ約0.5および約0.6M NaClでMono Sから溶出する。

B. 組換えhLFまたはhLF改変体の変異誘発および発現

変異タンパク質のインビトロ変異誘発および発現は周知であり、そして一般的にAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York(1987)およびSambrookら、Molecular Cloning -A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載され、これらの両方ともその全体でおよびすべての目的で参考として本明細書に援用される。Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82:488（部位特異的変異誘発を記載する）およびRobertsら、1987, Nature 328:731-734またはWells, J.A. ら（1985）Gene 34:315（カセット変異誘発を記載する）もまた参照のこと。

ラクトフェリンおよびラクトフェリン改変体は、周知の組換え技法を使用して培養された細胞によって発現され得る。代表的には、所望のポリペプチドをコードする核酸が、発現ベクターで使用される。句「発現ベクター」とは、一般的に、このような配列と適合可能な宿主において構造遺伝子の発現に影響を及ぼし得るヌクレオチド配列をいう。これらの発現ベクターは、代表的には、少なくとも適切なプロモーター配列および必要に応じて転写終結シグナルを含む。発現をもたらすために必要または助けとなる追加の因子もまた、本明細書に記載のように使用され得る。本発明のラクトフェリンポリペプチドをコードするDNAは、代表的には、インビトロ細胞培養物への導入および発現を可能にするDNA構築物に組

込まれる。しばしば、本発明の核酸は、適切な組換え宿主細胞を産生するために使用され得る。詳細には、DNA構築物は、細菌（例えば、E. coli）のような原核生物宿主における複製に適切であるか、または培養された哺乳動物、植物、昆虫

（例えば、Sf9）、酵母、菌類、もしくは他の真核生物細胞株に導入され得る。

特定の宿主、例えば、昆虫または細菌への導入について調製されるDNA構築物は、代表的には、宿主によって認識される複製系、所望のポリペプチドをコードする目的のDNAセグメント、ならびにポリペプチドコードセグメントに作動可能に連結される転写および翻訳開始ならびに終結調節配列を含む。DNAセグメントは、別のDNAセグメントとの機能的関係に配置される場合、作動可能に連結される。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写を刺激するならば、コード配列に作動可能に連結される。シグナル配列についてのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現されるならば、ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。一般的に、作動可能に連結されるDNA配列は隣接し、そしてシグナル配列の場合、両方とも隣接しそしてリーディングフレーム内である。しかし、エンハンサーは、これが転写を制御するコード配列に隣接する必要がない。連結（linking）は、便利な制限部位で、またはその代わりに挿入されるアダプターもしくはリンカーで、連結（ligation）によって達成される。適切なプロモーター配列の選択は、一般的に、DNAセグメントの発現について選択される宿主細胞に依存する。適切なプロモーター配列の例には、当該技術分野で周知の原核生物および真核生物プロモーターが挙げられる。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第2版), 第1～3巻 Cold Spring Harbor Laboratory(1989)を参照のこと。転写調節配列には、代表的には、宿主によって認識される異種エンハンサーまたはプロモーターが挙げられる。適切なプロモーターの選択は宿主に依存するが、trp、lac、およびファージプロモーターのようなプロモーター、tRNAプロモーター、ならびに解糖系酵素プロモーターが公知であり、そして利用可能である。Sambrookら(1989)を参照のこと。

ポリペプチドコードセグメントについての挿入部位とともに複製系ならびに転写および翻訳調節配列を含む便利に利用可能な発現ベクターが用いられ得る。細

胞株および発現ベクターの実行可能な組み合わせの例は、SambrookらおよびVettersら, Nature 334:31-36(1988)に記載される。例えば、適切な発現ベクターは、例えば、昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）、哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞）、および細菌細胞（例えば、E. coli）で発現され得る。

好ましい実施態様では、ヒトラクトフェリンおよび改変体は、ウシ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ブタ、またはマウスのようなトランスジェニック動物（すなわち、ヒト介在によって導入された生殖系列および体細胞のゲノム中に外因性DNA配列を含む非ヒト動物）における発現によって産生される。トランスジェニック非ヒト種による組換えポリペプチドの産生のための方法は当該技術分野で公知であり、そして例えば、米国特許第5,304,489号；第5,633,076号；および第5,565,362号（これらは参考として本明細書に援用される）、ならびにPCT公開PCT/US93/05724およびPCT/US95/09580（両方とも参考として本明細書に援用される）に記載される。トランスジェニック動物の有利点は、特に経済的精製方法による、大量でのLFの単離である。例えば、乳腺分泌細胞における発現について標的したヒトラクトフェリンポリペプチドをコードするトランスジーンを含むトランスジェニックウシ種の産生は、W091/08216に記載され、これは参考として本明細書に援用される。ラクトフェリン改変体がトランスジェニックウシで産生される場合、ヒトタンパク質は、使用（例えば、患者への投与）前にウシ乳汁タンパク質（例えば、乳漿タンパク質、カゼイン、ウシラクトフェリン、IgA、アルブミン、リゾチーム、 β -ラクトグロブリンなど）から分離され得る。あるいは、使用は、ヒトラクトフェリンタンパク質または改変体を含む全体または部分精製されたウシ乳汁から作製され得る。

C. hLF塩基性クラスターを中和するための代替方法

hLFの第1または第2の塩基性クラスターにおける残基の欠失は、変化した生理学的特性を有するhLFを生成するための好ましい方法であるが、1つまたは両方の塩基性クラスターを中和するための他の方法が存在する。例えば、第1の塩基性クラスターは、ヘパリンのようなリガンドとhLFをインキュベートすることによって中和され得、これは、第1のクラスターで結合し、そして105kdラクト

フェリンレセプター、LPS、ヒトリゾチーム、および結合が第1のクラスター依存性である他の分子へのラクトフェリンの結合を阻害する。

第1の塩基性クラスターを中和するための好ましい方法は、アミノ末端で結合しそして第1の塩基性クラスターと標的分子（例えば、ヘパリン）との間の結合

を抑制するモノクローナル抗体とhLFをインキュベートすることである。モノクローナル抗体を産生するための方法は周知である（例えば、Godingら、*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*（第2版）Acad. Press, N.Y.、ならびにHarlowおよびLane、*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照のこと）。ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体の使用は、これが患者への投与後の抗原応答の可能性を減少させるので、最も好ましい（例えば、米国特許第5,569,825号および第5,585,089号を参照のこと）。モノクローナル抗体の抗原結合フラグメント（例えば、Fab、Fab' F(ab')₂、Fabc、およびFvフラグメント）は、同様に有用である。抗体または抗体フラグメントもまた、第2の塩基性クラスターに結合しそして第2のクラスター依存性結合を抑制するために使用され得ることが認識される。

IV. ラクトフェリンおよびラクトフェリン改変体の特性

A. ヘパリン、リビドA、DNA、およびヒトリゾチームへの結合。

天然hLFは、ヘパリン、リビドA、DNA、およびヒトリゾチーム（hLZ）に結合する。本発明の1つの発見は、第1の塩基性クラスターの1、2、または3つのアルギニンを欠くLF改変体が、これらの4つのリガンドの各々への反応性の強力な減少を示し、そして4つすべてのアミノ末端アルギニン残基が欠失される場合、結合が、標準的アッセイ（例えば、固相リガンド結合アッセイ）で検出不可能であることである。

天然LFおよびLF改変体の結合特性は、標準的結合アッセイ（以下の項5.3.2を参照のこと）で測定され得、そしてリガンドへの天然LFの結合のレベルが100%反応性として定義される場合の反応性の用語によって表され得る。LF改変体の、天然LFリガンドヘパリン、DNA、リビドA、およびhLZとの反応性は、代表的には、80%未満、より通常には60%未満、しばしば15%未満である。いくつかのLF改

変体（例えば、第1の塩基性クラスターからの4つすべてのアルギニン残基の欠失を有するもの）について、反応性は検出不可能である。

B. 結合アッセイ

天然LFおよびLF改変体によるヘパリン、リピドA、DNA、およびヒトリソチームへの結合のような、リガンド-レセプター相互作用を測定するために適切なアッセイには、固相リガンド結合アッセイおよび競合的固相結合アッセイのアッセイが挙げられる（例えば、Mannら, 1994, *J. Biol. Chem.* 269:23661-67を参照のこと）。好ましい実施態様では、以下の実施例Iに記載のような固相結合アッセイは、ラクトフェリン改変体および天然LFによる結合を測定するために決定される。代表的には、hLFまたはhLF改変体によるLFレセプターの結合は、LFレセプターの活性化を生じる。レセプター活性化をアッセイする方法は公知であり、例えば、得られる細胞内カルシウムシフトが測定され得る（例えば、Misraら, 1994, *J. Biol. Chem.* 269:18303-306）。

C. 細胞膜関連レセプターへの特異的結合

hLFの生物学的活性のいくつかは、鉄と強くキレート形成する能力に関連するが、他の活性は、腸細胞（Huら, 1990, *Biochemistry* 29, 535-541; Kawakamら, 1991 *Am. J. Physiol.* 261, G841-G846; Mikogamiら, 1994, *Am. J. Physiol.* 267, G308-G311）、乳腺上皮細胞（Rochardら, 1992, *Anticancer Res.* 1, 2047-2052）、肝細胞（Regoecziら, 1985, *Am. J. Physiol.* 248, G8-G14; MacAbeeら, 1991, *J. Biol. Chem.* 266, 23624-23631; Ziereら, 1992, *J. Biol. Chem.* 267, 11229-11235）、単球（Ismailら, 1993, *J. Biol. Chem.* 268, 21618-21625）、活性化したリンパ球（Mazurierら, 1989, *Eur. J. Biochem.* 179, 481-487）、および血小板（Leveugleら, 1993, *Eur. J. Biochem.*, 213, 1205-1211）を含む標的細胞とhLFとの相互作用に関連し、これらの各々は、その全体およびすべての目的で参考として本明細書に援用される。

LFは、LF結合部位の2つのクラスを通じて細胞表面に結合する：細胞表面硫酸化分子（例えば、細胞表面プロテオグリカンまたはグリコサミノグリカン）である比較的低い親和性部位および高親和性レセプター。1つの局面では、本発明は

、部分的に、低親和性部位への結合が、塩基性アルギニン残基の第1のクラスターによって媒介され、そして1つ以上のこれらの残基の欠失（または中和）が、低親和性部位への結合を減少または除去するという発見に基づく。したがって、本

発明のhLF改変体は、代表的には、少なくとも約10nM、通常は約10nMと約40nMとの間の親和性で高親和性LFレセプターを結合する。細胞結合アッセイは周知であり、そして例えば、Mazurier, 1989, *Eur. J. Biochem.* 179:481-87、ならびに以下の実施例IIに記載される。逆に、1つ以上のアミノ末端アルギニン残基の欠失は、高親和性LFレセプターへの結合を減少または消滅しない。

高親和性LF結合部位は、活性化されたリンパ球、乳腺上皮細胞、血小板、単球、マクロファージ、腸細胞、および肝細胞で見い出されており、そして同様に他の細胞タイプに存在すると考えられる。105kD特異的hLFレセプターは、活性化されたリンパ球（Mazurierら, 1989, *Eur. J. Biochem.* 179, 481-487）、Jurkat T細胞株（Biら, 1994, *Eur. J. Cell Biol.* 65, 164-171; Biら, 1996, *Eur. J. Cell Biol.* 69, 288-296）、および血小板（Leveugleら, 1993, *Eur. J. Biochem.*, 213, 1205-1211）において特徴づけられている。

105kDレセプターへのLFの結合は、血小板凝集を阻害することが示されており、そしておそらくhLFの増殖因子および/または分化活性に関与する。このレセプターは、被覆小窩小胞ならびに細胞内小胞において細胞表面へ、ヒトリンパ芽球腫T細胞（すなわち、Jurkat細胞、Pawelecら, 1982, *Eur. J. Immuno.* 12:387-92）において局在化されている。Jurkat細胞によるhLFのインターナリゼーションが実証されている。Jurkat細胞は、12301 Parklawn Dr., Rockville, Maryland, USA 20852に位置するAmerican Tissue Type Collectionアメリカンタイプカルチャーコレクション[ATCC]から得られ得る。LFは、約40nMのkDを有するリンパ球（Jurkat細胞）高親和性レセプターに結合する。

105kDレセプターは、免疫学的方法によって同定され得る。例えば、特異的ウサギ抗105kDレセプターポリクローナル抗体が記載されている。これは、すなわち類似のポリクローナル抗体、または抗105kDレセプターモノクローナル抗体は

、他の細胞タイプにおけるレセプターを同定するために使用され得る。例えば、上でいわれるポリクローナル抗体は、非悪性ヒト乳ガン、良性乳腺症、および乳ガンからの上皮細胞に結合することが見いだされている (Rochardら, 1992, *Anticancer Research* 12:2047-52)。あるいは、105kDレセプターは、標識されたhLF (またはアミノ末端欠失したhLF) および細胞の膜タンパク質調製物を使用する

リガンドプロッティング (例えば、Ausubelら, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New Yorkを参照のこと) によって同定され得る。

特異的hLFレセプターは、腸刷子縁膜から単離されており、そして110の報告されたM_rを有する (KawaskamiおよびLonnerdal, 1991, *Am. J. Physiol.* 261:G841-46)。おそらく、このレセプターが、105kDレセプターと同じまたは密接に関連するが、まだ証明されていない。

肝細胞では、LFは、キロミクロンレムナントレセプターまたは細胞表面に存在するLDL-レセプター関連タンパク質 (LRP) に結合する。LFは、キロミクロンレムナントを含む β -VLDLの取り込みを阻害する。マウス腹膜マクロファージに結合するラクトフェリンは、リボタンパク質および他の血漿タンパク質のエンドサイトーシスを媒介する構造関連細胞表面レセプターファミリーのメンバーである、低密度リボタンパク質レセプター関連タンパク質 (LRP) を介して明らかに生じる。単球およびマクロファージに結合するhLFの性質は、完全には特徴づけられないが、少なくとも一部は、LRP/キロミクロンレムナントレセプターのメンバーを媒介するようである (Misraら, 1994, *J. Biol. Chem.* 269:18303-306)。

V. 薬学のおよび栄養的適用

A. 効能

ラクトフェリンは、治療設定に有益性を提供する多くの生物学的活性を示す。これらには、抗炎症、抗ウイルス、および抗感染活性、ならびにプロ凝固効果および抗凝固効果、補体活性化の調節、好中球のLPS媒介活性化の阻害、転写の調節、腸上皮細胞の増殖促進、ヒドロキシルラジカル形成の阻害、ならびに腸鉄取り込みおよび排出における役割が挙げられる。ラクトフェリンの他の特性および

生物学的活性は、Nuijensら, 1996, *J. Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1:3, 283-293に記載され、これは、その全体および目的について参考として本明細書に援用される。

本発明のヒトラクトフェリン改変体、および中和されたラクトフェリンは、一般的に、第1の塩基性クラスターのアルギニンの欠失が、以下の実施例に記載の

ように、ヘパリン、リビドA、DNA、リゾチーム、および細胞表面硫酸化分子への結合の減少を生じること以外は、天然ラクトフェリンと同じ活性および使用を有する。したがって、本発明のLF改変体は、LF投与の他の生理学的結果（例えば、結合によるヘパリンの中和）を引き起こすことなく、特定のLF媒介生理学的変化（例えば、サイトカインの調節）をもたらすために患者に投与され得る。本発明の中和されたhLFおよびhLF改変体は、種々の有利な特性を有する。例えば、第1の塩基性クラスターを欠くhLF改変体は、hLF-レセプター媒介免疫および炎症応答（例えば、減少するサイトカイン放出、ナチュラルキラー細胞の活性化、および抗腫瘍効果）、栄養性鉄の効率的レセプター媒介送達、ならびに他の生物学的効果を開始するために特に有用である。

hLFおよびLF改変体の治療効能には、局所感染、大規模（細菌）感染、血液由来感染（敗血症）を含む感染、ならびに感染または非感染炎症性疾患から生じる炎症（例えば、回腸または結腸の慢性炎症性疾患）の治療または予防での使用が挙げられる。ヒトLFおよびLF改変体はまた、感染の効果に対して器官移植レシピエントまたは他の免疫抑制された個体（例えば、AIDS患者）を調製または処置するために使用され得る。

ヒトLF、LF改変体、および中和されたhLFはまた、ラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体を投与することによって、患者においてラクトフェリン-レセプター保有細胞からの、IL-1、IL-2、またはTNF α のようなサイトカインの放出を減少または阻害するために有用である。ラクトフェリンは、細胞からのサイトカイン（例えば、IL-1、IL-2、およびTNF α ）の放出を減少させ、そして混合されたリンパ球培養物における増殖を阻害することが示されている（Chiericiら, 1994, *Acta Pediatr Suppl* 402:83-89）。hLFおよび改変体によるLPSに応答する

単球からのIL-1およびTNF。放出の抑制は、炎症部位で好中球の補充および活性化をダウンレギュレートすることが期待される（例えば、Lonnerdalら, 1995, *Ann Rev Nutr* 15:93-110を参照のこと）。LFの抑制効果は、ラクトフェリンの単球ラクトフェリンレセプターへの結合によって媒介されと考えられ（Miyazawaら, 1991, *J. Immunol.* 146:723-729）、そしてマウスにおけるLPS-媒介TNF応答が、ラクトフェリンの前投与によって減弱されたので（Lonnerdalら, 前出）、E

*coli*の致死用量を静脈内注射したマウスにおけるラクトフェリンの予防効果の原因であり得る（Sanchezら, 1992, *Arch Dis Child.* 67:657-661）。サイトカイン放出を測定するための方法は周知である（例えば、ELISA）。試薬の存在下でのサイトカイン放出のレベルが、アッセイ条件下で試薬の非存在下で放出されるレベルの約90%未満、より頻繁には約70%未満、および最も頻繁には約50%未満である場合、試薬は、細胞からのサイトカインの放出を減少または阻害するといわれ得る。

ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体は、TNF α 媒介好中球脱顆粒を低下させるために患者に投与され得る。好中球は、敗血症、慢性関節リウマチ、および潰瘍性大腸炎を含む、一般化および局所的の両方の炎症反応に、重要なメディエーターとして関与している。例えば、抗TNFモノクローナル抗体を使用する臨床研究は、TNF、およびおそらく好中球のTNF媒介活性化が、慢性関節リウマチおよび潰瘍性大腸炎の病理生理学に重要な役割を果たすことを示す。

ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体の患者への投与は、患者においてナチュラルキラー（NK）細胞を刺激することに有用である。hLFおよびラクトフェリン改変体はナチュラルキラー（NK）細胞の刺激を引き起こすので、LF改変体は、NK細胞の標的、例えば、腫瘍、ウイルス、および細胞内病原体と闘うために有用である。ラクトフェリンによるナチュラルキラー（NK）細胞の刺激は、インビトロ（Shauら, 1992, *J. Leukoc. Biol.* 51:343-349）およびインビボ（Bezaultら, 1994, *Cancer Res.* 54:2310-2312）で示されている。NK細胞は、ヒトラクトフェリン改変体および薬学的賦形剤を含む組成物を患者に投与することに

よって、患者において刺激され得る。ヒトLFおよび改変体はまた、固形腫瘍の増殖を阻害するために患者に投与され得る。LFの単回腹腔内注射は、マウスにおいて同系線維芽細胞由来腫瘍細胞株の皮下注射によって誘導される固形腫瘍の増殖を阻害した (Bezaultら, 前出)。したがって、LF改変体は、ヘパリンの中和または他の望ましくない効果のないNK細胞の刺激に有用である。

本発明はまた、hLFまたは改変体を患者に投与する工程を包含する、ウイルス、例えば、CMV (サイトメガロウイルス) ウイルス、HIV (ヒト免疫不全ウイルス) ウイルス、またはHSV1 (単純ヘルペス1型ウイルス) ウイルスの細胞への侵入を

阻害するための方法を提供する。抗ウイルス作用は、(i)細胞侵入のためのウイルス粒子によって用いられる細胞表面プロテオグリカン (例えば、ヘパリン) と hLFとの相互作用、および(ii)hLFおよびLF改変体によるNK細胞の刺激によって、媒介される。

他の局面では、本発明は、鉄で少なくとも約95%飽和されたヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体の組成物を患者に投与する工程によって、患者におけるラクトフェリン-レセプター保有細胞に鉄を送達する方法を提供する。これらの化合物の投与は、例えば、貧血または鉄蓄積疾患の処置に有益である。LF結合した鉄またはLF改変体結合した鉄は、ポリペプチド-鉄複合体が細胞レセプターに結合しそして細胞によってインターナリゼーションされる場合、細胞に送達される。したがって、本明細書に開示される組成物は、乳児処方 (baby formula) における使用ならびに鉄代謝における障害のある患者への投与に適切である (例えば、鉄欠乏性貧血および鉄蓄積疾患、ならびに未熟児の鉄不足貧血)。LF改変体は、van Berkelら, 1995, Biochem J: 312, 107-114に記載される手順に従って、鉄で飽和され得る。本発明のラクトフェリン改変体組成物は、代表的には、鉄で少なくとも3%飽和、より通常は80%飽和、最も頻繁には少なくとも95%飽和、および頻繁には99%以上飽和される。第1の塩基性クラスター、または第1および第2の塩基性クラスターの両方を欠くLF改変体が、LFの鉄結合活性が所望される場合、および塩基性クラスター1および2によって媒介される活性 (例

えば、ヘパリン結合、高親和性レセプター相互作用)が所望されない場合、特に有用である。

LF改変体は、炎症性疾患の処置に特に有用である。したがって、他の局面では、本発明は、ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体が、例えば、慢性炎症性腸疾患(例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎)における炎症を減少させるために患者に投与される方法を提供する。hLFおよびhLF改変体の投与は、心筋梗塞後の患者における再灌流障害を減少させるために有用である。

ヒトラクトフェリンは、LPS(細菌リポ多糖)を中和するために投与され得る。LPSは、第1の塩基性クラスターによって結合し、そして第2の塩基性クラスターによって循環からクリアランスされる。

他の局面では、本発明は、ヒトラクトフェリンまたはラクトフェリン改変体が、骨髓造血を阻害しそしてGM-CSFの産生を減少させるために患者に投与される方法を提供する。

第2の塩基性クラスターを欠くが第1の塩基性クラスターの残基を保持するヒトLF改変体は、同様に、治療適用を有する。このような改変体は、例えば、LF高親和性レセプターを活性化することなくヘパリンまたはLPSを中和するために有用である。このような改変体はまた、細胞へのウイルス侵入を阻害するために使用される。

B. 薬学的組成物

本発明のヒトラクトフェリンおよびラクトフェリン改変体は、薬剤、食品添加物、栄養補充物などとして使用され得る。本発明の薬学的組成物は、通常静脈内または経口投与される。皮内または筋肉内投与もまた、いくつかの状況で可能である。

代表的には、hLF/改変体は、患者にポリペプチドを送達するために適切な任意の適合可能な非毒性物質を含む薬学的賦形剤またはキャリアとともに投与され、この場合、薬学的組成物と呼ばれ得る。滅菌水、アルコール、脂肪、蠟、および不活性固体が、賦形剤またはキャリアとして使用され得る。薬学的に受容可能なアジュバント、緩衝化剤、分散化剤などもまた、薬学的組成物に組み込まれ得る。

。薬学的組成物中のポリペプチドの濃度は、広く、すなわち、約0.1重量%以下から、通常少なくとも約1重量%から、20重量%以上までも、変化し得る。

経口投与について、ヒトラクトフェリンまたは改変体は、カプセル剤、錠剤、および粉剤のような固体投与形態で、またはエリキシル剤、シロップ剤、および懸濁剤のような液体投与形態で投与され得る。本発明の薬学的組成物は、食品、代表的には乳汁、例えば、牛乳とともに投与され得る。投与のこの態様は、ラクトフェリン/改変体が、トランスジェニックウシ、ヤギ、またはウサギのようなトランスジェニック動物での発現によって産生される場合、利点を有する。トランスジェニックウシ乳汁におけるラクトフェリンの産生は、ヒト消費のために精製がほとんどまたは全く必要でないマトリクスを提供するので、所望される。

静脈内注入のための代表的組成物は、100~500mlの滅菌リンゲル溶液および100~500mgの組換えポリペプチドを含むように作製され得る。筋肉内注射のための代表的薬学的組成物は、例えば、1mlの滅菌緩衝化水および1~100 μ gのラクトフェリンポリペプチドを含むように作製される。非経口投与可能組成物を調製するための方法は、当該技術分野で周知であり、そして例えば、Remington's Pharmaceutical Science (15版, Mack Publishing, Easton, PA, 1980) (その全体がすべての目的のために参考として援用される) を含む、種々の出典により詳細に記載される。

化合物を含む組成物は、予防および/または治療的処置のために投与され得る。治療適用では、組成物は、疾患に既にかかっている患者に、疾患およびその合併症の徴候を治癒または少なくとも一部を緩和するために十分な量で、上記のように投与される。これを達成するために適切な量は、「治療有効量または用量」と定義される。このような有効投与量は、疾患または症状の性質および重篤度に、および患者の健康の一般的状態に依存するが、一般的に、体重1キログラム当たり約1~500mgの精製したタンパク質の範囲であり、1キログラム当たり約5~100mgの投与量が、より普通に用いられる。

予防適用では、本発明の化合物を含む組成物は、特定の疾患の疑いのあるまたはそうでなければ危険性のある患者に投与される、このような量は、「予防有効

量または用量」であると定義する。この使用でも再度、正確な量は、患者の健康および体重の状態に依存する。代表的には、用量は、体重1kg当たり1~500mgの精製したタンパク質の範囲であり、1kg当たり約5~100mgの投与量がより普通に用いられる。

実施例

実施例に引用した参考文献は、実施例2の後リストを挙げる。

実施例1

この実施例は、LFの第1の塩基性クラスターからのアルギニン残基の欠失（すなわち、本発明のLF改変体を産生するために）が、ヘパリン、DNA、リピドA、

およびヒトリソチームへの結合を除去または減少させることを証明する。

I. 材料および方法

A. 試薬

変異誘発プライマー、S Sepharose、およびCNBr活性化Sepharose 4Bを、Pharmacia Fine chemicals AB(Uppsala, Sweden)から得た。リピドA (Salmonella minnesota Re595から)、ヘパリン（ナトリウム塩、グレードI-A、ブタ腸粘膜から）二本鎖仔ウシ胸腺DNA、硫酸プロタミン、およびポリクローナルウサギ抗hLF抗血清を、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)から購入した。ヒトLFをまた、Sigmaから購入したか、または下記のように精製した。ヒトリソチーム (hLZ) を、記載のように精製した[5]。NHS-LC-ビオチンを、Pierce(Rockford, Ill, USA)から得た。ストレプトアビジンビオチン化HRPO複合体および¹²⁵IをAmersham (Bucks., UK)から得た。MaxisorbおよびPolysorbマイクロタイタープレートを、Nunc(Roskilde, Denmark)から得た。Universal結合プレートを、Costar(Cambridge, MA, USA)から得た。すべての細胞培養試薬を、Gibco(Paisley, UK)から得た。

B. hLFの精製、鉄飽和、およびビオチン化

ヒトLFを、記載のように[5]S Sepharoseでの陽イオン交換クロマトグラフィーによって新鮮なヒト乳汁から精製した（さらに「天然hLF」と命名した）。天然hLFを鉄で3.5%飽和し：天然hLFの鉄での完全飽和を記載のように[5]行った。天

然hLFを、25倍モル過剰のビオチンとの20℃での2時間のインキュベーションによってビオチン化した。非結合ビオチンを、10mMリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.4 (PBS) に対する16時間の透析によって除去した。ビオチン化hLFを、0.02%アジ化ナトリウムを含むPBS中で4℃にて保存した。

C. 抗hLFモノクローナル抗体の産生および精製

Balb/Cマウスを、既述のように[7]50 μ g天然hLFでの反復腹腔内注射によって過剰免疫した。4回目の注射の4日後、脾臓細胞を、SP2/0-Ag14[ATCC CRL 1583]ミエローマ細胞と融合した。融合およびハイブリドーマ選択を、記載のように[8]行った。培養上清を、最初にラジオイムノアッセイ (RIA) によって特異的抗体の存在についてスクリーニングし、ここでは¹²⁵I-hLFを抗原として使用した。hLF特異的抗体を産生するハイブリドーマを、反復限界希釈によってクローニングした。総計で、10の異なる抗hLFモノクローナル抗体 (mAb) を得た。培養上清の免疫グロブリン富化画分を、硫酸アンモニウム沈殿によって調製し、そしてSepharose (1gのCNBr活性化Sepharose 4Bに対して20mgのタンパク質) にカップリングしたか、または製造業者の推奨のようにRepligen抗体精製キット (Cambridge, MA, USA) での抗hLF mAbの精製のために使用した。精製した調製物の抗体濃度を、1.4の値を使用して、280nmでの吸光度測定によって決定した。

D. N末端欠失したhLF変異体の発現および精製

アミノ酸Ser¹~Lys¹¹¹をコードする発現ベクターpCMV/hLF¹⁻¹¹¹を、記載のように[9]Transformer¹部位特異的変異誘発キットで産生した。変異誘発プライマー配列は、ヌクレオチド352~364の欠失を作製するためにhLF cDNAのヌクレオチド365~379 (太字; [2]) に融合したウシaS₁カゼインシグナル配列の最後の14ヌクレオチド (下線: [10]) からなった [5' CTGTTGCTCTTGCCAGTGTTCAGTGGTGC3'] であった。pCMV/hLF¹⁻¹¹¹を構成的に発現するヒト293(S)[ATCC CRL 1537]細胞を、記載のように[9]生成し、そして50U/mlペニシリンおよび50 μ g/mlストレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地で無血清馴化した。S Sepharoseを上清と4時間バッチ式でインキュベートし、カラムに注ぎ、そして20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、pH7.5で溶出した。S Sepharose溶出物を、20mMリン酸ナ

トリウム、pH7.5 (緩衝液A) で希釈し、Mono S HR 5/5陽イオン交換カラムにアプライし、そして60mlの緩衝液A中0~0.5M NaClの直線塩勾配で0.5ml/分の流速で溶出した。天然hLFは0.7M NaClで溶出するが[5]、N末端を欠失したrhLF変異体 (さらにrhLF¹⁻¹と命名した) は、hLF特異的ELISAで決定した場合0.33M NaClで溶出したようであった[9]。

E. N末端短縮型天然hLFの単離

2つ (Gly¹-Arg¹; hLF¹⁻¹と命名) または3つ (Gly¹-Arg¹-Arg¹; hLF¹⁻³と命名) のN末端残基を欠くヒトLF改変体を、上記のようにMono SクロマトグラフィーによってSigmaの精製ヒト乳汁ラクトフェリンから単離した。hLF¹⁻¹およびhLF¹⁻³種は、それぞれ、0.5および0.6M NaClでMono Sから溶出する。

F. 固相リガンド結合アッセイ

マイクロタイタープレートを、1 μ g/mlリビドA (Polysorb) ; 10 μ g/ml hLZ (Universal結合プレート) ; 25 μ g/mlヘパリン ; またはdsDNA (Maxisorb, 硫酸プロタミンでプレコーティングされている (H₂O中0.5mg/ml)) を含むPBSで16時間コーティングした。PBS、0.02% (w/v) Tween-20での洗浄後、プレートを、PBS、0.02% (w/v) Tween-20、0.2% (w/v)ゼラチン (PTG) で試験サンプルの連続希釈とともにインキュベートした。2時間後、プレートを洗浄し、そして1%正常ウシ血清を含むPTG中0.4 μ g/mlペルオキシダーゼ結合した精製ウシ抗hLFとともに1時間インキュベートした。別の洗浄後、基質溶液 (0.11M酢酸ナトリウム、pH5.5中0.01% (w/v) TMB、0.003% (v/v) H₂O₂) を添加した。基質変換を、2M H₂SO₄の添加によって停止し、そして450nmでの吸光度をSLT 340 ATCCマイクロプレートリーダー (SLT-labinstruments, Austria) で読みとった。すべてのインキュベーションを、100 μ l容量で行った。

種々のリガンドに対する異なるhLF種の反応性を決定するために、欠失した¹hLF改変体およびN末端が未処理の天然hLF (参照として使用される) の連続希釈を、hLF抗原についてのリガンド結合アッセイおよびELISAで並行して試験した (hLF濃度の差を較正するために)。リガンドのそれぞれに対するhLF改変体の反応性を、任意に100%として定義した天然hLFとの応答のパーセントとして表した。

G. 固相リガンドへのhLF結合の競合阻害

ビオチン化hLF (100ng) を、PTG中の競合物の連続希釈と16時間ブレインキュベートし、上記のようにコーティングしたマイクロタイタープレートに添加した。2時間後、プレートを洗浄し、そしてストレプトアビジンビオチン化HRP0複合体と30分間インキュベートした。第2の洗浄後、基質溶液を添加した。さらなる手

順を記載のように行った。結果を、競合物なしでのビオチン化hLFの応答の阻害のパーセントとして表した。

H. 組換えN-またはC-ローブ (lobe) に対するモノクローナル抗hLF抗体エピトープのマッピング

Polysorbプレートを、1 μ g/ml精製mAbを含むPBSで20°Cにて16時間コーティングした。プレートを洗浄し、そして天然hLF (100ng/ml) の連続希釈および組換えN-ローブまたはC-ローブのいずれかを分泌する安定な293(S)細胞株の馴化培地と2時間インキュベートした。洗浄後、結合したhLFを、記載のように、ペルオキシダーゼ結合したウシ抗hLFで検出した。

I. 抗hLF-Sepharoseへの異なるhLF種の結合を比較するためのRIA手順

これらのRIAの技術手順は、hLF抗原についてのRIAについて記載されたとおりであった。簡単にいえば、Sepharoseにカップリングした抗hLF mAbを、hLF改変体の連続希釈物とインキュベートした。結合したhLFを、ポリクローナル¹²⁵I-抗hLF抗体との続いてのインキュベーションによって検出した。結果を、添加した標識した抗体の総量の結合パーセントとして表した。

II. 結果

A. ヒトラクトフェリンは、ヘパリン、リピド (lipid)、hLZ、およびDNAと特異的に相互作用する。

固相リガンド結合アッセイを、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAとのhLFの相互作用を研究するために開発した。図1は、マイクロタイタープレートに固定したリガンドのそれぞれに対する天然hLFの結合を示す。hLFを、コーティングしていないプレートまたはウシ血清アルブミンでコーティングしたプレートとイ

ンキュベートした場合、結合は観察されなかった（結果を示さず）。これらの結果は、hLFが、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAに特異的に結合することを示す。

次に、これらのリガンドへの天然および鉄飽和したhLFの結合を特徴づけた。

表1は、同一の IC_{50} 値を有する両方のhLF種が、ヘパリン、リピドA、およびhLZへのhLFの結合について競合したことを示し、これは、各リガンドに対する天然および鉄飽和したhLFの同一の親和性を示す。サイズおよび構造がhLFに密接に関連する金属結合タンパク質である、ヒトトランスフェリン（hTF）での阻害は見られず、このことはhLF-リガンド相互作用の特異性を確証づけた。

hLF上のヘパリンおよびDNAの結合には、静電的相互作用が挙げられ、これはイオン強度を増加させることによって破壊され得る。図2は、LPSおよびhLZへのhLFの結合におけるNaCl濃度の効果を示す。生理学的NaCl濃度（0.15M）では、約40%のhLFがLPSおよびhLZに結合した。塩濃度を減少させると、LPSおよびhLZに結合するhLFを、0.013M NaClでそれぞれ約75%および55%まで増加させたが、0.4M NaClを超えてNaClを増加させると結合が消滅した。これらの結果は、リガンドへのhLFのイオン強度依存性を示し、そしてタンパク質のカチオン性の高いN末端が、hLFのリガンドとの静電的相互作用に関連することを示唆する。

表 1

hTFとではなく非標識hLFとのhLFリガンド相互作用の阻害

リガンド	IC ₅₀ ^a 競合物 (nM)		
	天然hLF	鉄飽和したhLF	hTF
ヘパリン	9.5±1.9	10.4±1.5	競合なし
リピド	1.7±0.5	1.3±0.4	競合なし
hLZ	11.2±2.2	15.4±4.0	競合なし

^a 12.5Mビオチン化hLFとの応答の50%阻害を得るための競合物の濃度。結果は、少なくとも4つの独立した実験の平均±SDである。

B. 領域Arg¹-Arg¹Arg¹-Arg¹はヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAへのhLFの結合に必須である。

hLF-リガンド相互作用におけるhLF N末端での4つの連続するアルギニン（「第1の塩基性クラスター」）の寄与を描写するために、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAへのN末端が欠失したhLF種の結合を研究した。hLF⁻¹と命名し

た、Gly¹-Arg¹を欠く天然hLFは、N末端未処理hLFよりも、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAに対してそれぞれ2、1.5、3、および3倍低い親和性を示した（表2）。hLF⁻¹と命名した、Gly¹-Arg¹-Arg¹を欠く天然hLFは、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAに対してそれぞれ8、4、17、および17倍低い親和性を示した。hLFの結合は、Arg¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹を欠く変異体rhLF⁻¹ではなかった（表2）。これらの結果は、4つのすべてのアルギニンが、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAとhLFとの相互作用に寄与すること、および第1の塩基性クラスターの除去がこれらのリガンドとhLFとの相互作用を消滅させることを示す。

表 2

ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAへのN末端欠失したhLF種の結合

	反応性 (%)			
	ヘパリン	リピドA	hLZ	DNA
天然hLF	100	100	100	100
hLF ^{-2N}	55.6±4.1	67.8±10.2	37.5±12.4	31.2±2.1
hLF ^{-3N}	12.7±2.0	25.7±3.1	5.1±2.1	5.8±1.2
rhLF ^{-5N}	結合なし	結合なし	結合なし	結合なし

C. モノクローナル抗体E11はhLF-リガンド相互作用を阻害する。

10の異なる精製抗hLF mAbを、固定されたリガンドへのhLFの結合を阻害する能力について試験した。図3の結果は、hLFの抗hLF mAb E11とのブレインキュベーションが、ヘパリン(A)、リピドA(B)、およびhLZ(C)とhLFとの相互作用を完全にブロックし得るが、コントロールmAbはhLF結合に影響を及ぼさなかったことを示す。固相リガンドへのhLF結合を完全に防止するために必要とされる、ブレインキュベーション混合物中のmAb E11およびhLFのモル比の差は、おそらく、各リガンドおよびmAb E11に対するhLFの親和性の差（異なるリガンドおよびmAbとのh

LFの界面におけるわずかな差のため)ならびに固定されたりガンドの量の差から生じる。驚くべきことに、E11以外のすべての抗hLF mAbはhLF-リガンド相互作用

を増加させる(図3はmAb E3との代表的結果を示す)。後者は、おそらく、モノマーhLFより、固定されたりガンドに対する高い親和性を有するダイマー複合体を含むmAbによる、2つの固相結合したビオチン化hLF分子の架橋のためである。

D. mAb E11のエピトープはhLFのN末端にある。

hLF上にmAb E11エピトープを位置決定するために、天然hLFの連続希釈および組換えN-またはC-ローブのいずれかを含有培養上清を、マイクロタイタープレート上に固定したE11に添加した。図4Aは、E11が組換えN-ローブに結合することを示す。図4BおよびCは、抗N- (E3; 図4B) および抗C-ローブ (E19; 図4C) mAbを使用したコントロール実験を示す。mAb E11 (図4A) およびmAb E3 (図4B) でのELISAにおけるrN-ローブ中のN-ローブ抗原検出の天然hLF中の検出との比較分析は、結合したhLFの検出のために使用されたポリクローナル抗hLFが、E11エピトープに対するより、mAb E3エピトープに対して指向する、より多くの抗体を含むことを示唆する。

2つのN-ローブ特異的mAb E3およびE11 (図4) を、Sephacroseにカップリングし、そしてrhLF¹⁻¹¹、hLF¹⁻¹¹、hLF¹⁻¹¹、および天然hLFの精製サンプルの連続希釈とインキュベートした。E3-SephacroseでのRIAにおいてこれらのhLF種の用量応答曲線は、同一勾配および最大応答を示し(図5B)、このことは、N末端欠失したhLFおよび天然hLFが、mAb E3によって等しく良好に結合し、そしてポリクローナル抗体によって検出されることを示唆した。E3およびE11でのRIAにおける応答の比較は、rhLF¹⁻¹¹およびhLF¹⁻¹¹におけるN末端残基の除去が、E11によるこれらのhLF改変体の結合に影響を及ぼすことを示す(減少したプラトー値および非平行曲線によって表されるので)。これらの結果は、N末端アルギニン残基がE11エピトープの一部であることを意味する。mAb E11へのrhLF¹⁻¹¹の結合が完全に廃棄されなかったという観察は、E11エピトープがまたArg¹のC末端の残基を含むことを示す。

III. 議論

これらのデータは、単一の領域Arg¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹が、hLZおよびポリアニ

オン（ヘパリン、リピドA、DNAのような）とhLFとの特異的静電的相互作用を決定することを示す。データは、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAとhLFの相互作用において4つのアルギニンのN末端から2番目のストレッチの必須の役割を、明確に証明する。結合は、連続するArg残基の除去において減少し、そしてArg¹~Arg¹を欠く変異体であるrhLF¹⁻¹では消滅した。後者の観察は、Arg¹およびArg¹がhLF-GAG相互作用に重要であると結論した、Mannら、前出と一致する。しかし、1つまたは2つのN末端アルギニン残基を欠く天然hLF種でのこここで示される結果は、Arg¹およびArg¹がまた、ヘパリン、リピドA、hLZ、およびDNAとhLFとの相互作用に寄与することを示す。残基Arg¹およびArg¹が、ヒト、ヒツジ、ウマ、ウシ、およびブタLFに保存されることは注目すべきことである。マウスLF（mLF）は、これらの位置で1対の塩基性残基を欠く[32]。実際、mLFは、Mono Sクロマトグラフィー[1]において0.3M NaClで、すなわち、実際にrhLF¹⁻¹と同じ位置で溶出し、そしてリガンドへのhLFの結合と競合しない。

変異体rhLF-5Nは、20μg/mlまでの濃度が固相結合アッセイで添加される場合でさえ、任意のリガンドと相互作用する能力を喪失した。さらに、LPSおよびヘパリンへの組換えC-ローブの結合は検出可能ではない。明らかに、N-ローブの第1の塩基性クラスターArg¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹に相同である、C-ローブの塩基性クラスターArg¹¹¹-Arg¹¹¹-Ala¹¹¹-Arg¹¹¹は、これらのリガンドと相互作用し得ない。これは、Arg¹¹¹-Arg¹¹¹-Arg¹¹¹-Arg¹¹¹の前の3つの連続するグルタミン酸（Glu¹¹¹-Glu¹¹¹-Glu¹¹¹）および／または正電荷の表面曝露によるものであり得る。N末端トリプシン処理フラグメントでのC末端トリプシン処理フラグメントの少量の夾雑は、LPSへのC末端トリプシン処理フラグメントの見かけの結合を説明するようである[11]。鉄を含まないhLFおよび鉄飽和したhLFは、ヘパリン凝固活性を中和する同じ能力を有することが見いだされている[3]。天然のhLFおよび鉄飽和したhLFが、ヘパリン、リピドA、およびhLZへのhLFの結合について等しく十分に競合したことを表1で示し、これは、両方のhLF種がこれらのリガンドについて同一の親和性を有することを示唆する。したがって、鉄の取込みの際

にhLFで生じるコンホメーション変化は、明らかに、N末端リガンド結合部位の突出に影響を及ぼさない。実際、結晶学は、鉄でのhLFの飽和において、N

-ロープの2つのドメインは剛体として回転し、N末端の相対位置を本質的に影響を受けないままにすることを示した[12]。モノクローナル抗体E11は、リビドA、ヘパリン、およびhLZとhLFとの相互作用を特異的に阻害し、そしてArg¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹にまたはその近くに結合することがマッピングされた(図5)。これは、hLF-リガンド相互作用におけるこの領域の重要性を確認する。

発明者らは、ヒト乳汁LFの多くの市販の調製物が、0.5および0.6M NaClで溶出する、3または2個のN末端残基を欠くhLF種の種々の量を含むが、N末端がインタクトなhLFは、0.7M NaClでMono Sから溶出することを、これまでに見いだした。hLFは、SDS-PAGE分析によって評価されるようにインビトロでのトリプシン処理タンパク質分解に非常に抵抗性であるが、実験は、N末端アルギニン2および3で最初におよび比較的容易に切断が生じることを証明した。N末端で切断された多くのhLFを含む調製物は、ヘパリン、LPS、hLZ、およびDNAとの相互作用がhLF作用に対する基礎である生物学的アッセイにおいて、インタクトなhLFよりも低い比活性を提示するようである。切断されたhLFがヘパリン抗凝固活性を中和しそのためトロンビン形成および凝固を増強する能力は、おそらく、インタクトなhLFの能力よりも低い。細胞表面GAGに対するウイルス結合のhLFによる妨害が、実際に、抗ウイルス効果の基礎であるならば、切断されたhLFは、CMVでの感染をあまり効果的に予防しないかもしれない。切断されたhLFが好中球のLPS誘導性プライミングを阻害する能力は、減少するようである。同様に、核DNAへの結合による遺伝子転写の効果は、切断されたhLFであまり生じないようである。LPSへのhLFの結合およびそれからの効果[6]が、抗菌効果全体における重要な決定要素であるならば、いくつかのグラム陰性細菌に対する切断されたhLFの抗菌活性は減少する。故意または夾雑物としてのいずれでも、生物学的系中のリガンドの存在はまた、別のリガンドとの相互作用が、活性に重要であるならば、または複合体の活性がhLF単独の効果を超える場合、hLFの生物学的活性に影響を及ぼし得る。例えば、ヘパリンは、*Staphylococcus aureus*[13]へのhLFの結合をブロックす

ることが示されている。RNAおよびDNAは、hLFがナチュラルキラー細胞の細胞傷害性を増加させる能力を阻害した[14]。リポドAとhLFのプレインキュベーションは、ヘパリンへの結合を完全にブロックし得た。hLFのLPSでの夾雑は、hLFの骨

髄抑制効果[33]、単球性IL-1およびTNF放出の抑制、ならびに増強されたfMLPが引き起こしたスーパーオキシド放出についての好中球のLPSプライミングの阻害[4]を除去する。0.4M NaClでの乳汁からのhLFのバッチ式抽出は、hLFおよびLPSでのこのタンパク質の夾雑を抑制する効果的手段である。しかし、また、N末端短縮したhLFが、いくつかの他の生物学的系においてインタクトなhLFより高い比活性または他の異なる性能を提示し得るようである。循環からのhLFの迅速な肝クリアランスは、少なくとも2つのクラスのhLF結合部位、すなわち、多数の低親和性結合部位（おそらく細胞会合型プロテオグリカン）およびキロミクロンレムナントレセプターおよび/またはLDL-レセプター関連タンパク質（LRP）を提示するさらに少数の高親和性結合部位を含む[15、16]。Ziereらは、ラット肝細胞キロミクロンレムナントレセプターへの結合およびその後のインターナリゼーションが、最初の14個のN末端残基がアミノペプチダーゼ処理によって除去されているhLFで増加したことを示した[16]。N末端短縮されたhLF種では、細胞表面に会合した硫酸化分子への切断されたhLFの「低親和性」結合は、Jurkatヒトリンパ芽球T細胞における豊富な低親和性結合部位を示す。これらの結果は、特異的レセプターへのhLFの結合が、hLFの第2の塩基性クラスターを含むという明確な証拠を提供する。したがって、hLFの制限されたN末端タンパク質分解は、より大きな割合のhLFを特異的レセプターに結合するようにシフトさせ、したがっておそらくhLF免疫調節活性を変化させ得る。

実施例 2

この実施例は、LF改変体が、Jurkat細胞LFレセプターに高親和性で結合するが、硫酸化細胞表面分子には結合しないかまたは天然LFに比較して低い親和性で結合することを証明する。

I. 材料および方法

A. 化学薬品

大豆トリプシンインヒビター (SBTI、I-S型)、ウシ膵臓トリプシン (III-S型)、および塩素酸ナトリウムを、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。制限エンドヌクレアーゼおよびオリゴヌクレオチドを、Eurogentec (Seraing, Belgium) から得た。T4リガーゼ、ウシアルカリホスファターゼ、およびpBluescript SKを、Stratagene (La Jolla, U.S.A.) から得た。Sequenase DNA配列決定キットを、United States Biochemical Corporation (Cleveland, U.S.A.) から得た。線状化したAcNPV DNAを含むBaculogoldキットおよびアガロスを、Pharmingen (San Diego, U.S.A.) から購入した。プラスミドpVL1392および細胞株 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) は、C. Auriault 博士 (Institut Pasteur, Lille, France) から善意で提供された。キャリアを含まない Na^{125}I を、ICN Pharmaceuticals (Orsay, France) から、そして Iodo-Beads を、Pierce (Rockford, U.S.A.) から得た。Sephadex G25 PD-10 カラムを、Pharmacia-LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden) から購入した。RPMI 1640 培地およびウシ胎児血清 (FCS) を、それぞれ、Techgen International (Les Ulis, France) および D. Dutscher (Brumath, France) から得た。SF90011 昆虫細胞培地およびゲンタマイシンを、Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France) から得た。すべての他の化学薬品は、分析グレードであった。

B. タンパク質

天然の hLF を、既述 [24] のようにイオン交換クロマトグラフィーによって単一のドナーの新鮮なヒト乳汁から精製した。ウシLf は、Biopole (Brussels, Belgium) によって提供された。マウスLf を、以下のようにマウス乳汁から単離した：マウス乳汁を、0.01% (w/v) SBTI、10mM 塩酸ベンズアミジン、0.05% ヘキサジメトリンブロミド (Polybrene)、10mM EDTA、1mM PMSF、および 0.8M NaCl を含むリン酸緩衝化生理食塩水、pH7.5 (PBS) で2倍希釈した。希釈した乳汁を、40,000g で4℃にて1時間、スイングアウトローターで回転して、乳漿、カゼイン (ペレット)、および脂肪を分離した。乳漿画分を、20mM リン酸ナトリウム、pH7.5 (緩衝液A) で希釈し、そしてS-Sepharoseカラムにアプライした。カラムを、0.2

M NaClを含む緩衝液Aで洗浄し、そして0.5M NaClを含む緩衝液Aでのブロッキングによって溶出した。S-Sepharose溶出画分を、緩衝液A中でMono S HR 5/5カラム(Pharmacia, Upsalla, Sweden)に戻した。結合したタンパク質を、15ml

緩衝液A中0~0.5M NaClの線型塩勾配で0.5ml/分の流速で溶出した。0.28M NaClで溶出するマウスLfを、さらなる実験に使用した。タンパク質の均一性を、SDS/PAGE[25]によってチェックした。ラクトフェリンの鉄飽和を、他[26]に記載のように行った。ヒト血清トランスフェリンを、Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) から得た。非改変rhLfを、[27]に記載のようにつづいた。

C. アミノ酸1~5を欠くN末端欠失したhLf変異体の発現および精製

hLfをコードする全長2.3kbp cDNAを、記載[28]のように、ヒト乳腺cDNAライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) から得た。Sculptorインビトロ変異誘発システムキット(Amersham International, Amersham, Bucks, U.K.)を使用して、hLfのGly¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹をコードする配列5'-GGCCGTAGGAGAAGG-3'[19]を欠失した。この目的のために、変異誘発オリゴヌクレオチド: 5'-CTGTGTCTGGCTAGTGTTCAGTGGTG-3'を合成した。変異誘発のためのテンプレートは、ファージM13mp11であり、これはpBluescript SKプラスミド[28]にクローニングしたコード配列の310bp EcoRI-AccIフラグメント (ヌクレオチド295~606[19]) を含んでいた。変異誘発後、欠失を、DNA配列分析によって確認し、そして変異したEcoRI-AccIフラグメントを、記載[28]のようにhLfの全長cDNAの3'相補的部分とともに、pBluescript SKに連結し戻した。最後に、変異したcDNAを、pVL1392にサブクローニングし、pVL1392-rhLf^{Δ1-5}構築物を得た。組換えバキュロウイルス、Sf9昆虫細胞培養物の産生、およびN末端欠失したrhLf変異体 (本明細書では以下「rhLf^{Δ1-5}」と命名した) の産生を、[27]に報告されるようにつづいた。組換えタンパク質を、0.2M酢酸ナトリウム、pH7.8で平衡化したSP-Sepharose Fast Flowカラムで、細胞培養培地から精製し、そして0~1M NaClの線型塩勾配で溶出した。rhLf^{Δ1-5}の純度を、7.5% SDS-PAGEでチェックした。rhLf^{Δ1-5}のN末端アミノ酸配列分析を、Applied BioSystem 477 Protein Sequencerを使用して、エドマン分解手順によってつづいた。

D. SDS-PAGE分析

非還元および還元hLfのSDS-PAGEを記載[18]のように行った。タンパク質を、クーマシーブリリアントブルーで染色し、そしてhLfタンパク質バンドを、Signal Analytics (Vienna, VA, U.S.A.)のIPlabGelソフトウェアを使用してデンストメトリーによって定量した。

E. タンパク質の放射標識

種々のラクトフェリン改変体の¹²⁵I標識を、触媒としてヨードビーズを使用して行った。2つのヨードビーズを、1.5mlポリプロピレン遠心チューブ中で1ml PBSで2回洗浄し、そして100ml PBS中0.2mCiの放射性ヨウ素とともに室温にてブレインキュベートした。次いで、100ml PBS中100mgタンパク質を混合物に添加し、そして4℃にて10分間インキュベートした。容量を、PBSで500mlに調節し、そして遊離のヨウ素を、無血清RPMI 1640で平衡化したPD-10カラムでのゲル濾過によって除去した。放射性ヨウ素化したタンパク質の比活性を、280nmでの吸光度を測定することによって推定し、そしてCompugamma LKB-Wallac (Turku, Finland) γ放射線カウンターで計数した。

F. 細胞培養

Jurkat細胞を、5 mg/mlゲンタマイシン、2mM L-グルタミン、20mM Hepes、および10%熱不活化FCSを含む、RPMI 1640培地pH7.4中で、5%CO₂下で湿潤雰囲気にてルーチンで培養した。細胞を、対数増殖期に保ち、そして結合実験の1日前に4 × 10⁴/ml (細胞カウンターを使用することによって決定した) の細胞密度まで希釈した。24時間後、細胞生存能力をトリパンブルー染色を使用してチェックした。次いで、細胞を、氷冷無血清RPMI 1640で2回洗浄し、そして4℃、200gにて10分間の遠心分離によって採取した。

G. 塩素酸ナトリウムでのJurkat細胞の処理

Jurkat細胞を、10%FCS、5 mg/mlゲンタマイシン、および30mM塩素酸ナトリウムを含む新鮮なRPMI 1640培地中4 × 10⁴/mlの細胞密度まで希釈した。塩素酸ナトリウムの非存在下でインキュベートした細胞を、コントロールとして使用した。塩素酸処理の24時間後、細胞を計数し、そして細胞生存能力を、トリパンブル

を用いて評価した。

H. 細胞結合実験

平衡結合実験を、0.4%(w/v)ヒト血清トランスフェリンを含む無血清RPMI 1640中で行って、hLfの細胞またはプラスチックへの非特異的結合を防止した。5.10⁶細胞を含むアリコート(100ml)を、1.5mlポリプロピレン遠心チューブに添加し、そして¹²⁵I-標識したタンパク質の連続希釈物(0~80nMの範囲の濃度)とともにインキュベートした。タンパク質との細胞のインキュベーションを、0.01%(w/v)アジ化ナトリウムの存在下で4℃にて1時間行って、リガンドインタナライゼーションを防止した。細胞を、1ml RPMIを用いる7分間の180gでの遠心分離によって3回洗浄し、0.5ml PBSに再懸濁し、そして結合した放射能を測定した。非標識hLfの100倍モル過剰の存在下で測定した非特異的結合は、代表的には、総結合の約25%であり、そして特異的結合を得るために総結合から差し引いた。結合パラメータ(Kdおよび細胞当たりの結合部位数)を、Enzfitterプログラムソフトウェア1.05(vioSoft)を使用して、スキッチャードプロット分析[29]によって算出した。

II. 結果

A. N末端欠失したhLf改変体の調製

ArgおよびLys残基の後ろを特異的に切断するセリンプロテアーゼである、トリプシンによるhLfの制限されたタンパク質分解を研究した。5mg量の天然のhLfを、PBS中37℃にて1:8の酵素:基質モル比でトリプシンとともにインキュベートした。切断を、12倍モル過剰のSBTIの添加によって1、5、25分、および3時間後に停止し、そしてN末端の完全性を、分析用Mono Sクロマトグラフィー[18]によって評価した。結合したタンパク質を、30ml緩衝液A中0~1.0M NaClの線型塩勾配を用いて1.0ml/分の流速にて溶出した。溶出したタンパク質を、280nmでの吸光度測定によって検出した。相対量(%)を、ピーク面積を積分することによって算出した。表3は、1時間のトリプシン処理後に、20%および80%のhLf分子が、それぞれ残基Gly¹-Arg¹-Arg¹またはGly¹-Arg¹を欠くので、すべてのhLf分

子が、

N末端切断されていることを示す。3時間後、総hLf分子の2%、49%、および42%は、それぞれ、残基Gly¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹（さらに「hLf¹⁻⁴」と命名）、Gly¹-Arg¹-Arg¹（さらに「hLf¹⁻³」と命名）、およびGly¹-Arg¹（さらに「hLf¹⁻²」と命名）を欠いた。

表 3

天然のhLfの制限されたトリプシン処理タンパク質分解後に得られる

N-末端欠失したhLf改変体の相対量

時間 (分)	総hLfの相対量 (%)			
	hLf ^{-4N}	hLf ^{-3N}	hLf ^{-2N}	intactなhLf
0	0	0	0	100
1	0	20	80	0
5	0	22	78	0
25	1.0	28	70	0
180	2.0	49	42	0

ヒトLfを、Lys¹⁻¹¹の後ろでトリプシンによって切断し、これは、Mr 39,000および51,000の主要NおよびC末端トリプシン処理フラグメントを生じる[30,31]。1、5、25分、および3時間のトリプシン処理後に得られるhLf¹⁻¹¹およびhLf¹⁻¹¹の非還元サンプルのSDS-PAGE分析は、Arg¹およびArg¹の後ろのペプチド結合のトリプシン処理タンパク質分解が、Lys¹⁻¹¹の後ろの切断前に生じること、すなわち、Mr39,000および51,000のトリプシン切断フラグメントが、1および5分切断から得られたサンプルで観察されなかったことを示した（図6）。25分後、少量のNおよびC末端トリプシン処理フラグメントの存在が観察された。1%未満の総タンパク質は、Mr 39,000および51,000のフラグメントに切断された。3時間後、これらのフラグメントは、総hLfの約5%を示した。

B. 残基1～5を欠く組換えhLfの調製

Arg¹は、天然のhLfの制限されたトリプシン処理によって切断され得なかった

。したがって、さらに rhLf¹¹ と命名した、最初の 5 つの N 末端アミノ酸のいずれかを欠く組換え hLf (rhLf) 変異体を発現した。線状化したバキュロウイルスおよび pVL1392-rhLf¹¹ を使用して、Sf9 細胞を形質転換し、そして rhLf¹¹ 発現クローンを ELISA [17] によって選択した。このクローンの培養培地を、SP-Sepharose Fast Flow カラムにロードし、そして rhLf¹¹ は、0.4M NaCl で単一ピークとして溶出した。タンパク質は、SDS-PAGE によって Mr 78,000 の単一タンパク質のバンドとして現れた。rhLf¹¹ の N 末端、Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val を、アミノ酸配列分析によって確認した。組換え体 hLf¹¹ を、培養培地 1 ml あたり 8 mg の最大収量で得た。

C. 天然の Lf および N 末端欠失した hLf 種の Jurkat 細胞への結合

Jurkat ヒトリンパ芽球 T 細胞への結合における hLf の Arg¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹ (「第 1 の塩基性クラスター」) の役割を描写するために、0 ~ 80 nM の範囲の濃度での ¹²⁵I-標識した天然の hLf および N 末端欠失した hLf 種の結合を研究した。図 7 は、すべての hLf 種の結合が、濃度依存性的および飽和可能であったことを示す。さらに、すべてのタンパク質の結合を、非標識ラクトフェリンの 100 倍モル過剰の存在下で約 75% 阻害し、これは、結合が可逆的および特異的であったことを示唆した。スキッチャード分析は、使用した hLf 濃度の範囲で、N 末端欠失した hLf の親和性が、N 末端がインタクトな hLf と比較した場合、有意に増加したことを示した (図 8a)。K_d は、hLf または rhLf についての 69 または 81 nM から、hLf¹¹、hLf¹²、および hLf¹³ についての 65、57、および 41 nM までそれぞれシフトした。rhLf¹¹ について顕著に減少した 12.4 nM の K_d が観察された。さらに、細胞当たりの結合部位の数が、N 末端がインタクトな hLf についての 110,000 から、hLf¹¹ および rhLf¹¹ の両方についての 20,000 まで減少したことが見いだされた (図 8b)。hLf¹¹ および hLf¹² は、それぞれ約 75,000 および 35,000 の結合部位に結合した。これらの結果は、Jurkat 細胞上の約 80,000 の結合部位への hLf の結合が、Gly¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹ の存在に依存することを示唆する。

ラクトフェリン-Jurkat 細胞相互作用の種特異性を評価するために、¹²⁵I-hLf

bLf、およびmLfの結合を研究した。図9は、bLfの結合曲線がhLfの結合曲線に匹敵することを示す。したがって、算出されたKdおよび細胞当たりの結合部位の数は、顕著な違いはなく、すなわち、両方のLf種について約60nMおよび100,000部位/細胞であった(図11)。一方、mLfは、細胞当たり約8,000の結合部位に結合し、31nMのKdを有した。mLfのこれらの結合パラメータは、hLf¹¹またはrhLf¹¹で得られる結合パラメータに匹敵する(図8b)。

D. Jurkat細胞へのhLf種の結合に対する、塩素酸ナトリウム処理の影響

硫酸化されたGAG(例えば、硫酸ヘパリン、デルマタン硫酸、またはコンドロイチン硫酸)が、Jurkat細胞へのhLfの結合をどの程度決定するかを評価するため、これらの細胞を、塩素酸ナトリウムで前処理した。塩素酸塩は、ATPスルフィラーゼのインヒビターであり、したがってスルホトランスフェラーゼについての活性スルフェートドナーであるホスホアデノシンホスホスルフェートの産生のインヒビターである。塩素酸塩は、細胞増殖またはタンパク質合成を妨害することなく、インタクトな細胞において炭水化物残基の硫酸化をなくすことが示されている[22、23]。Jurkat細胞を、30mM塩素酸ナトリウムの非存在または存在のいずれかで24時間増殖した2つのプールに分割した。塩素酸塩は、Jurkat細胞の増殖速度にも形態にも影響を与えなかった。細胞を洗浄し、そして0~80nMの範囲の濃度の¹²⁵I-hLf、hLf¹¹、およびrhLf¹¹とともにインキュベートした。図11および12は、Jurkat細胞の塩素酸塩での処理が、天然のhLfについての結合パラメータに影響を及ぼしたことを示す。Kdは、塩素酸塩処理で71.1nMから62.6nMまでわずかに減少し、そして結合部位の量は、細胞当たり102,000から65,450まで減少した。細胞に結合した硫酸基の枯渇は、それぞれ、57.2nMおよび27.9nMのKd値を有するhLf¹¹またはrhLf¹¹のいずれかを認識する、類似の数の21,000の結合部位を生じた(図11および12)。結合部位のこの数は、hLf¹¹およびrhLf¹¹の両方についての未処理細胞で見られる数(約17,000部位/細胞; 図8)と非常に近い。したがって、塩素酸塩処理は、hLf¹¹の結合部位の数を35,600から21,100まで減少させ、これは、rhLf¹¹ではなくhLf¹¹がまだ、未処理のJurkat細胞の細胞表面に曝露された硫酸化された基と相互作用し得ることを示唆する。

III. 議論

この実施例は、リンバ芽球細胞株Jurkatへのこのタンパク質の結合におけるhLfのArg¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹の役割を示す。

天然のhLfの制限されたトリプシン処理タンパク質分解によって、Gly¹Arg¹、Gly¹-Arg¹-Arg¹、またはGly¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹のいずれかを欠く、大量のN末端欠失hLf改変体を得る。表3の結果は、Arg¹の後ろの切断が、Arg¹の後ろの切断の前に起こることを示す。hLf¹⁻¹を得る、Arg¹の後ろのペプチド結合のその後の切断は、ずっと遅い速度で起こる。SDS-PAGE分析は、使用した穏和な加水分解条件下で、タンパク質分解が主としてN末端で起こったことを示した。Lys¹⁻¹の後ろの内部トリプシン処理タンパク質分解は、切断の3時間後に総hLf分子の3%未満のみで示されたが、2、49、および42%の分子は、それぞれ、4、3、および2つのN末端残基を欠いた。これらの結果は、N末端のトリプシン処理タンパク質分解が、Lys¹⁻¹での主なトリプシン切断部位の後ろの切断の前に起こることを明確に示す。したがって、hLfのN末端の分解は、外分泌物で容易に達成されるようであり、このプロセスの生理学的重要性が疑われる。

天然のhLfのJurkat細胞への結合パラメータは、既述[34]のパラメータに近かったが、N末端アルギニンの1つのその後の除去は、親和性の漸進的増加、ならびに細胞当たりの結合部位の数の減少を生じた。これらの結果は、hLfのArg¹、Arg¹、およびより低い程度でArg¹が、総結合の約80%を示すJurkat細胞上の「低親和性」結合部位へのhLfの結合に相乗的に関連することを示す。hLfからのArg¹の除去は、おそらくLf特異的レセプターを表す、Jurkat細胞上の約20,000の「高親和性」結合部位についてのhLfの親和性を強力に増加させた(図8)。したがって、Arg¹は、ラクトフェリンレセプター結合部位の一部として既に同定された領域である[21]、第2の塩基性クラスター(Arg¹⁻¹-Lys¹⁻¹-Val¹⁻¹-Arg¹⁻¹)にhLfリンバ球レセプターが到達するための立体障害を提供するようである。これはまた、Arg¹が、トリプシン処理後にhLfから放出され得ない理由を説明する。hLfのX線結晶学的解析データ[20]は、実際、Arg¹が、水素結合によってタンパク質コアに連結されることを示す。したがって、Arg¹は、hLfの他の分子と

の相互作用よりも、hLfの構造の完全性により関連するようである。まとめると、これらの結果は、Arg¹ではなくArg¹、Arg¹、およびArg¹が、Jurkat細胞の表面での約80,000の低親和性結合部位へのhLfの結合を相乗的に必要とすることを示す。さらに、Jurkat細胞は、約20,000の高親和性結合部位（約20nMのKd）を含み、これはおそらく、以前[35]に特徴づけられたhLfレセプターを表す。高親和性結合部位のこのクラスへのhLfの結合は、第1の塩基性クラスターの存在を必要としない。

これらの結果は、Arg¹ではなくArg¹、Arg¹、およびArg¹が、Jurkat細胞上のプロテオグリカンの認識に寄与することを示唆する。

4つの連続するアルギニン残基のN末端クラスターは、hLfに独特である（図13）[36、32]。それにもかかわらず、bLfおよびhLfのJurkat細胞への結合に匹敵した。マウスLfは、hLf¹およびrhLf¹の結合パラメータに匹敵する、ずっと少ない数の結合部位（細胞当たり約10,000）への高親和性結合のみを示した。これは、hLfおよびbLfとは対照的に、mLfは、Jurkat細胞のs硫酸化分子と相互作用せず、リンパ球レセプターとのみ相互作用したことを示唆する。実際、mLfのN末端配列は、1位で1つのみのリジン残基を含むので、hLf配列（図13）とは異なり、mLfのプロテオグリカン相互作用がないことについての構造的基礎を提供する。ウシLfは、hLfのArg¹およびArg¹と相同な位置にArg残基およびLys残基を含む。両方のLf種のJurkat細胞への類似の結合は、bLfのN末端での他の塩基性残基が、プロテオグリカンと相互作用することを示す。塩基性電荷に関して、hLfおよびbLfの両方とも、残基1～37の間の異なる位置に類似の数の9つの塩基性アミノ酸を含むが、mLfは5つの塩基性残基しか含まないことに注目する価値がある。さらに、mLfは、hLfおよびbLfにおける1の代わりに1～37の領域に4つのGlu残基を有する。

結果として、これらのデータは、hLfのArg¹-Arg¹-Arg¹が、タンパク質のリンパ球への結合に関与することを示す。hLfの第1の塩基性クラスターは、主として硫酸化した細胞表面分子として同定された約80,000の低親和性結合部位と相互作用することが示された。約20,000のみの高親和性結合部位は、以前[35]に特徴づけられているhLfリンパ球レセプターに対応するようである。本明細書に記載

のN末端欠失したhLf改変体の定量的調製物は、リンパ球細胞の表面で発現する異なる結合部位の生物学的役割へのさらなる洞察を得る機会を提供する。

参考文献

1. Nuijens et al. (1996). Structure and biological actions of lactoferrin. *Journal of Mammary Gland Biologie and Neoplasia* 1: 285-295
2. Rey et al (1990). Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. *Nucleic Acids Res.* 18: 5288
3. H. F. Wu, R. L. Lundblad, and F. C. Church. (1995). Neutralization of heparin activity by neutrophil lactoferrin. *Blood* 85: 421-428
4. D. Wang, K. M. Pabst, Y. Aida, and M. J. Pabst. (1995). Lipopolysaccharide-inactivating activity of neutrophils is due to lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.* 57: 865-874
5. P. H. C. Van Berkel, M. E. J. Geerts, H. A. van Veen, P. M. Kooiman, F. Pieper, H. A. de Boer, and J. H. Nuijens. (1995). Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins can both bind iron and have identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibility towards tryptic proteolysis. *Biochem. J.* 312: 107-114
6. R. T. Ellison III, and T. J. Giehl. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* 88: 1080-1091
7. J. H. Nuijens, C. C. M. Huijbregts, G. M. Van Mierlo, and C. E. Hack. (1987). Inactivation of C1 inhibitor by proteases: demonstration by a monoclonal antibody of a neodeterminant on inactivated, non-complexed C1 inhibitor. *Immunology* 61: 387-389

8. G. Köhler, and C. Milstein. (1975). *Nature (London)* 256: 495-497
9. P. H. C. Van Berkel, H. A. van Veen, M. E. J. Geerts, H. A. de Boer, and J. H. Nuijens. (1996). Heterogeneity in utilization of N-glycosylation sites Asn624 and Asn138 in human lactoferrin : study with glycosylation site mutants. *Biochem. J.* 319: 117-122
10. D. Koczan, G. Hobom, and H. M. Seyfert. (1991). Genomic organization of the bovine aS1 casein gene. *Nucleic Acids Res.* 19: 5591-5596
11. E. Ellass-Rochard, A. Roseanu, D. Legrand, M. Trif, V. Salmon, C. Motas, J. Montreuil, and G. Spik. (1995). Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding of Escherichia coli 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem. J.* 312: 839-846
12. M. Gerstein, B. F. Anderson, G. E. Norris, E. N. Baker, A. M. Lesk, and C. Chothia. (1993). Domain closure in lactoferrin. Two hinges produce a see-saw motion between alternative close-packed interfaces. *J. Mol. Biol.* 234: 357-372
13. M. Paulsson, Å. Ljungh, and T. Wadström. (1994). Inhibition of lactoferrin and vitronectin binding to *Staphylococcus aureus* by heparin. *Current Microbiol.* 29: 113-117
14. H. Shau, A. Kim, and S. H. Golub. (1992). Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.* 51: 343-349
15. M. Mcilinger, M. Haumer, K. A. Szakmary, F. Steinbock, B. Scheiber, H. Goldenberg, and M. Huettinger. (1995). Removal of lactoferrin from plasma is mediated by binding to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor and transport to endosomes. *FEBS Lett.* 360: 70-74

16. G. J. Ziere, M. K. Bijsterbosch, and T. J. van Berkel: (1993). Removal of 14 N-terminal amino acids of lactoferrin enhances its affinity for parenchymal liver cells and potentiates the inhibition of beta- very low density lipoprotein binding. *J. Biol. Chem.* 268: 27069-27075
17. Mikogami, T., Heyman, M., Spik, G. and Desjeux, J.F. (1994) *Am. J. Physiol.* 267, G308-G315
18. van Berkel, P.H.C., Geerts, M.E., van Veen, H.A., Kooiman, P.M., Pieper, F.R., de Boer, H.A. and Nuijens, J.H. (1995) *Biochem. J.*, 312, 107-114
19. Rey, M.W., Woloshuk, S.L., De Boer, H.A. and Pieper, F.R. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 5288
20. Anderson, B.F., Baker, H.M., Norris, G.E., Rice, D.W. and Baker, E.N. (1989) *J. Mol. Biol.* 209, 711-734
21. Legrand, D., Mazurier, J., Ellass, A., Rochard, E., Vergoten, G., Maes, P., Montreuil, J. and Spik, G. (1992) *Biochemistry* 31, 9243-9251
22. Baeuerle, P.A. and Huttner, W.B. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 870-877
23. Keller, K.M., Brauer, P.R. and Keller, J.M. (1989) *Biochemistry* 28, 8100-8107
24. Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H., Vliegthart, J.F.G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 121, 413-419
25. Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680 - 685
26. Mazurier, J. and Spik, G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 399-409
27. Salmon, V., Legrand, D., Georges, B., Slomianny, M.-C., Coddeville, B. and Spik, G. (1996) *Protein Expression and Purification* - in press
28. Legrand, D., Salmon, V., Coddeville, B., Benaïssa, M., Plancke, Y. and Spik, G. (1995) *FEBS Lett.* 365, 57-60

29. Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660 - 672.
30. Legrand, D., Mazurier, J., Metz-Boutigue, M.H., Jollès, J., Jollès, P., Montreuil, J. and Spik, G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 787, 90-96.
31. Hutchens, T.W, Henry, J.F. and Yip, T.T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2994-2998
32. Z. Y. Qian, P. Jolles, S. D. Migliore, and A. M. Fiat. (1995). Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1243: 25-32-
33. H. E. Broxmeyer, D. E. Williams, G. Hanger, S. Cooper, P. Gentile, R. N. Shen, P. Ralph, S. Gillis, and D. C. Bicknell. (1987). The opposing actions in vivo on murine myelopoiesis of purified preparations of lactoferrin and the colony stimulating factors. *Blood Cells* 13: 31-48 35.
34. Bi, B.Y., Liu, J.L., Legrand, D., Roche, A.C., Capron, M., Spik, G. and Mazurier, J. (1996) *Eur. J. Cell Biol.* 69, 288-296
35. Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W.L., Montreuil, J. and Spik, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179, 481-487
36. Metz-Boutigue, M.H., Jollès, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. and Jollès, P. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145, 659-676.

実施例 3

この実施例は、インビトロでヒトラクトフェリンによるヘパリン抗凝固活性の中和を記載する。

1. 序論

薬物の抗炎症活性は、抗凝固化された血液が、エンドトキシンを含まない培地で10倍希釈されるWB（全血）アッセイを使用して分析され、そして96ウェルプレートに移され得る。推定抗炎症化合物の存在または非存在での、グラム陰性菌からのリポ多糖（LPS）、免疫複合体、またはサイトカインのような、前炎症性メディエーターの添加の効果は、血漿カスケード系の活性化（例えば、補体活性化、凝固系の活性化についてのトロンビン-アンチトロンビンIII複合体[TAT]、および/または単球サイトカイン産生および好中球の活性化）を測定することによって研究され得る。ラクトフェリンは、炎症の強力なメディエーターである、LPSのリピドA部分に高い親和性で結合する。LPSに結合するラクトフェリンの推定

生理学的結果を研究するために、一連の実験を、WB-アッセイでラクトフェリンと行った。WBが、ヘパリン処理した血液で、またはTFPI（組織-因子経路インヒビター）で抗凝固したWBで、行われた場合、前炎症性サイトカイン産生に対するラクトフェリンの効果で有意な差が示された。ヒトラクトフェリンがヘパリンに結合することが証明されている（van Berkelら, Biochem. J. 328, 145-151(1997)、Wuら, Arch. Biochem. Biophys. 317, 85-92(1995)、Mannら, J. Biol. Chem. 269, 23661-23667(1994)）。この相互作用は、インビトロでヘパリン活性の中和を生じる（Wuら, Blood 85, 421-428(1995)）。ラクトフェリンがヘパリンの抗凝固活性を阻害する能力を、ラクトフェリンの存在または非存在で抗凝固された全血培養物中でTAT複合体の量を測定することによって決定した。

II. 方法

A. プロトコル

新鮮なヒト血液を、培養培地（IMDM, Biowithaker）で10倍希釈し、そして100 μ g/mlラクトフェリンの存在または非存在で種々の濃度のヘパリン（Leo, Leo W eesp）で抗凝固化した。ウェルを、37℃にて2時間インキュベートした。サンプルを上清から採取し、そしてTAT複合体の量をELISAによって決定した。

B. タンパク質

天然hLF（Batch 67）、トランスジェニックhLF、ウシラクトフェリン、および市販のバッチServa hLF(Feinbiochemica, Heidelberg)を使用した。hLF¹⁻¹（Gly¹-Arg¹-Arg¹を欠く）を、Serva hLF(Feinbiochemica, Heidelberg)から単離した。

III. 結果

種々のラクトフェリン種での結果を、図14に示す。100 μ g/ml hLFの存在下では、約10倍多いヘパリンが、十分な抗凝固化された血液を得るために添加されなければならない（TAT値<20ng/ml）。ウシからのトランスジェニックhLFおよびマウスからのゲノムトランスジェニックhLFとの類似の曲線を得、これらが同様に良好にヘパリンを中和することを示した。hLF¹⁻¹は、N末端未処理hLFと比較した場合、8倍低い親和性でヘパリンに結合する。ServaのPeak IIIおよび天然h

LFよりもそれぞれ2.1および3.5倍低い効果でヘパリンを中和した。マウスからのcDNAトランスジェニックhLFを使用して得た比較的減少した効果は、おそらく、この調製物中の大量のポリプレンの存在による。

ウシラクトフェリン (bLF)、ヒトラクトフェリン、および硫酸プロタミンが種々のグリコサミノグリカン (ヘパリン、エノキサバリン、ヘパラン硫酸、およびN-アセチルヘパリン) を中和する能力も決定した。図15は、hLFおよびbLFが十分等しくヘパリンおよびエノキサバリン (低分子量ヘパリンである) を中和することを示す。ヘパラン硫酸およびN-アセチルヘパリンとの全血培養物は、TATのかなりの量を生じ、これらが、全血を抗凝固化するために有用ではないことを示す。hLF、bLF、または硫酸プロタミンのいずれかのヘパラン硫酸に対する効果はない。hLFおよびbLFによるN-アセチルヘパリンの少しの中和を観察した。

IV. 結論

上の結果は以下を示唆する：

1) ヒトおよびウシラクトフェリンはまた、エノキサバリン (所定の低分子量ヘパリンである) を中和する。

2) 種々の多型Arg^{1'}/Lys^{1'} 改変体 (hLFバッチ67は異種接合体Arg^{1'}/Lys^{1'}であり、ゲノムトランスジェニックhLFは同種接合体Arg^{1'}/Arg^{1'}である) 間に差がないようである。

3) N末端分解したhLF (hLF¹⁻¹¹) は、Peak III Serva hLFおよび天然hLF (box 67) とそれぞれ比較した場合、2.1および3.5倍低くヘパリンを中和する。

実施例 4

この実験は、天然hLF、N末端分解したhLF改変体、および鉄飽和したhLFの結合特性を記載する。

I. 序論

乳汁中の少量の鉄にもかかわらず、乳汁中の平均49%の鉄が吸収される。このレベルは、非強化牛乳および牛乳処方物からの10~12%と比較して高い。ヒト乳汁からの鉄のバイオアベイラビリティーを説明するために、ヒトラクトフェリン (hLF) の鉄吸収に対する可能性のある効果が、長く提案されている (Montreuil

ら, *Biochim. Biophys. Acta* 45, 413-421(1960))。1979年には、Coxらは、ヒト十二指腸粘膜の小片および ^{55}Fe 標識したhLFフラグメントを使用して、hLFからの鉄取り込みプロセスの証拠を提供した (Coxら *Biochim. Biophys. Acta* 588, 120-128(1979))。ウシラクトフェリン (bLF) からの取り込みが数倍減少しそしてヒトトランスフェリンおよびニワトリオボトランスフェリン (Ovatransferin) から観察されたので、この取り込みプロセスは、種およびタンパク質特異的であるようであった。これらの知見の後、母乳を与えられている乳児の糞便中の未処理のhLFの存在は、hLFが胃腸管の通過中にタンパク質分解攻撃を免れ得、そしてhLFが鉄吸収に関連し得るという考えを強化した (Spikら *Acta Pediatr. Scand.* 71, 979-985(1982))。

上記のように、本発明者らは、リンパ球上のhLF結合部位の2つのクラスの存在を同定した (Legrandら *Biochem. J.* 327841-846(1997)も参照のこと)。1つのクラスは、hLFの低親和性結合および多数の結合部位を示すが、第2のクラスは、高親和性結合および細胞当たり少数の結合部位を示す (前出、Legrandら *Biochem. J.* 327 841-846(1997))。天然および組換えhLF改変体との結合研究は、hLFの第1の塩基性クラスターが、低親和性結合部位 (おそらく、細胞会合したプロテオグリカン) と相互作用することを示した。hLF N末端におけるカチオン性残基の第2の塩基性クラスターは、リンパ球上の推定hLFレセプターとの高親和性相互作用に関連する。したがって、腸細胞上のhLF結合部位の2つのクラスの存在は、既に観察された腸細胞へのhLFの結合特性を説明し得る。この実験において、本発明者らは、N末端未処理hLFの結合パラメータをN末端分解したhLF改変体のパラメータと比較した。さらに、鉄飽和したhLF、bLF、mLF、およびウシからのトランスジェニックhLFの結合を分析した。

II. 方法

A. 結合アッセイ

ヒト結腸癌腫細胞株HT-29 (Mikogamiら *Am. J. Physiol.* 267, G308-G315(1994)) からの細胞を調製しそして凍結保存した。細胞を毎週継代培養し、そして10% FCSを含むDMEM中 2×10^4 細胞/cm² (24ウェルプレート中) に3週間播種し、十

分に分化した状態に達した。培地を毎日交換した。220 μ gのラクトフェリンを、Iodo-genを使用して 125 Iで放射標識した。細胞を、冷DPBSで3回リンスした。インキュベーション培地を、4.3mg/mlアボトランスフェリン+ラクトフェリン（種々の濃度で）を含むDPBS+（1 mM Ca^{2+} 、0.5mM Mg^{2+} ）中で調製し、そしてウェルに添加した。非特異的結合を、冷（cold）天然hLFの100倍モル過剰の存在下で決定した。4 $^{\circ}\text{C}$ にて1時間のインキュベーション後、50 μ lのインキュベーション培地を収集し、そして放射能を、ガンマカウンターで決定した。培地を除去した後、細胞をDPBSで5回リンスし、DPBS-EDTA中で採集し、そして細胞に付随する放射能を決定した。ラクトフェリンのあらゆる濃度を、2連で少なくとも3回研究した。

B. タンパク質

天然のヒトラクトフェリン、鉄飽和したhLF、トランスジェニックウシの乳汁から単離されたトランスジェニックhLF、ウシラクトフェリン、マウ斯拉クトフェリン、およびN末端欠失したhLFを使用した。Gly¹-Arg¹ (hLF¹⁻²)、Gly¹-Arg¹-Arg¹ (hLF¹⁻³)、またはGly¹-Arg¹-Arg¹-Arg¹ (hLF¹⁻⁴)を欠くヒトラクトフェリンを、制限されたタンパク質分解によって産生した（上記）。

III. 結果

図16は、天然hLFのHT-29細胞への結合を示す。図は、（100倍モル過剰の冷hLFの存在下で）総結合-非特異的結合である、hLFの特異的結合を示す。試験した濃度内で、結合は比較的飽和可能であった。スキッチャード分析（挿入図）は、これらの濃度内で、hLFが、1.1 μ Mの解離定数で細胞当たり 3.19×10^4 部位に結合したことを示した。図17は、より低いhLF濃度の結合曲線を示す。これらのデータのスキッチャード分析（図17の挿入図）は、細胞当たり 2.3×10^4 部位へのより高い親和性（36nM）での結合の存在を示した。同様の実験を、表4にまとめたように、他のラクトフェリンおよび改変体で行った。すべての実験で、天然hLFは、コントロールとして含まれた。結合パラメータは、総結合および高親和性結合に分割される。結果は、天然hLF、鉄飽和したhLF、ウシラクトフェリン、およびトランスジェニックウシからのトランスジェニックhLFの間の結合パラメー

タに差がないことを示す。マウスラクトフェリンは、HT-29細胞に結合しない。

1つのN末端アルギニンの除去は、結合パラメータに小さい影響を有するが、高親和性部位に対する親和性は、124nMの平均値まで減少する。2つのN末端アルギニンの除去後、高親和性結合がなくなった。1回のみの測定であるが、3つのN末端アルギニンを欠くhLFで、同じことが観察される。これらの結果は、N末端欠失したhLF改変体のJurkat細胞への結合研究とは異なり、ここでは、N末端アルギニンの除去は、細胞当たりの結合部位の数を減少させるが親和性を増加させる。これらの結果は、HT-29上の特異的レセプターはないが、HT-29に結合する大きい能力のみがあることを示唆する。

表 4 :

種々のラクトフェリン種のHT-29細胞への結合パラメータ。比較的大きい標準変動は、接着細胞の使用に関連する（ウェル対ウェル変動）。

	総結合部位 ((10 ⁶))	高親和性部位 ((10 ³))	総親和性 (μ M)	高親和性 (nM)	N
天然 hLF	3.9 \pm 1.5	3.3 \pm 1.9	1.0 \pm 0.5	74 \pm 30	14
Fe-hLF	3.2 \pm 0.3	2.6 \pm 2.5	1.0 \pm 0.3	66 \pm 40	3
トランスフェリン hLF	2.7 \pm 0.7	4.6 \pm 3.5	0.9 \pm 0.6	88 \pm 45	3
bLF	2.9 \pm 1.3	3.5 \pm 0.7	0.8 \pm 0.5	81 \pm 24	3
mLF	-	-	-	-	3
hLF ^{2N}	5.6 \pm 0.6	9.3 \pm 4.4 ^{a)}	0.8 \pm 0.1	124 \pm 8 ^{a)}	3
hLF ^{3N}	6.1 \pm 1.5	-	1.7 \pm 0.3	-	3
hLF ^{4N}	8.9	-	0.7	-	1

a) 天然 hLF とは有意に異なる (P < 0.01)。

N = 独立した実験の数。

N末端アルギニンの除去がHT-29への結合を廃止するという観察は、これらの部位への結合が、第1の塩基性クラスターによってのみ媒介されることを示唆する。これを試験するために、モノクローナル抗体mAb E11がHT-29細胞への天然hLFの結合をブロックする能力を試験した。このモノクローナル抗体は、細菌リポ多糖、ヘパリン (GAG) のようなリガンドへのhLFの結合をブロックし、そしてArg¹を含むエピトープにマッピングされた (前出、van Berkelら *Biochem. J.* 328, 14

5-151(1977))。図18は、2倍モル過剰のE11が、hLFのHT-29への結合を完全にブロックし得たことを示す。30 μ g/ml hLFの存在下でのスキャッチャード分析は、実際、hLF結合の総阻害によって可能ではなかった (示していない)。これらの結果は、hLFのHT-29細胞への結合が、第1の塩基性クラスターによってのみ媒介されることを確認する。

HT-29細胞へのhLF結合における塩素酸ナトリウムの効果を決定した (Jurkat細胞への結合については上記のとおり)。塩素酸は、タンパク質合成での妨害なしに未処理細胞上の炭水化物残基の硫酸化を阻害し、そして処理は、ヘパラン硫酸、デルマンタン硫酸、またはコンドロイチン硫酸のような硫酸化したグリコサミノグリカン (GAG) に頼る結合を同定するために使用され得る。HT-29細胞を、硫酸を含まない培地中で30nM塩素酸ナトリウムで24時間前処理した。結合実験を、上記のように行った。予備結果は、塩素酸処理が、ヒトラクトフェリンの結合パラメータに著しい効果がないことを示唆する。予備実験はまた、ヘパリナーゼIと行った。細胞を、硫酸を含まない培地中で37℃にて4時間、2.5U/mlヘパリナーゼIで前処理した。これらの予備結果は、未処理とヘパリナーゼ処理HT-29細胞との差があることを示唆しない。

IV. 結論

上記の結果は、HT-29細胞へのhLF結合が、第1の塩基性クラスターによって全体的に媒介されることを示す。この結論は、以下の結果に基づく：

- 1) N末端アルギニンの除去は、hLFのHT-29細胞への「高親和性」結合を廃止す

る。

2)結合は、Arg¹を含むエピトープに結合する、抗hLF mAb E11によって完全にブロックされる。

3)第1の塩基性クラスター全体を欠くマウスラクトフェリンは、HT-29細胞と相互作用しない。

結果は、さらに、HT-29で発現される特異的hLF-レセプターがないことを示唆する。これらの細胞への結合は、まだ同定されていない成分によってのみ生じる。可能性のある候補物は、グリコサミノグリカンまたはシアル酸（例えば、ムチン

での）である。したがって、hLF-レセプターメカニズムは、結腸での鉄取り込みを担うようではない。本明細書に示される結果に基づいて、これらのhLF改変体は、腸壁に結合せず、そしておそらく排泄される。

明快および理解の目的のために、本発明は、これらの実施例および上記の開示において幾分詳細に記載されている。しかし、特定の変更および改変が、添付の請求の範囲の範囲内で実施され得ることが明らかである。すべての刊行物および特許出願は、それぞれが個々にそのように示されているかのような同じ程度まで、すべての目的のために、その全体が参考として本明細書に援用される。

【 図 1 】

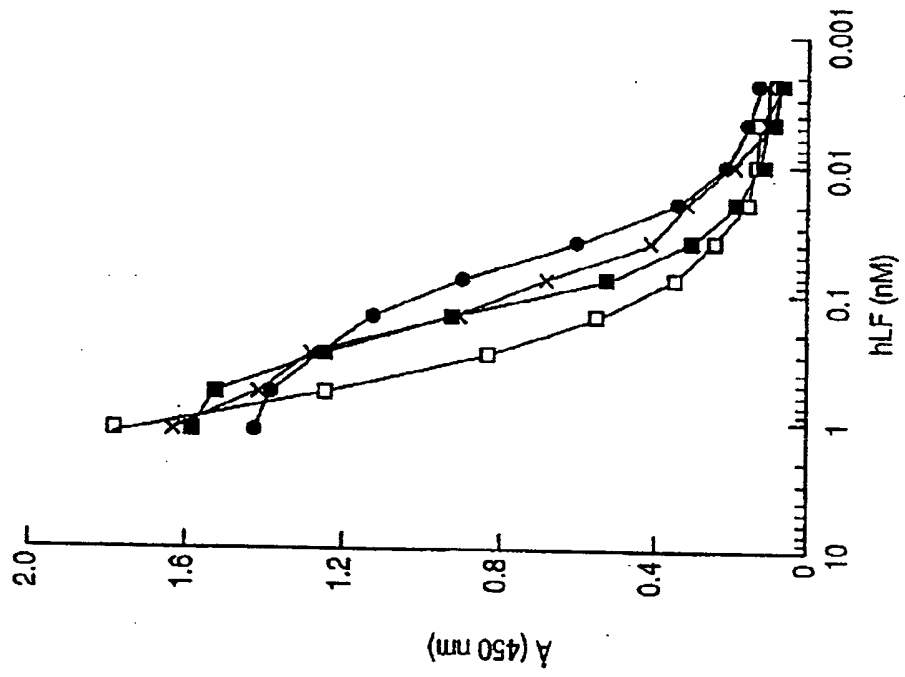


FIG. 1

【 図 2 】

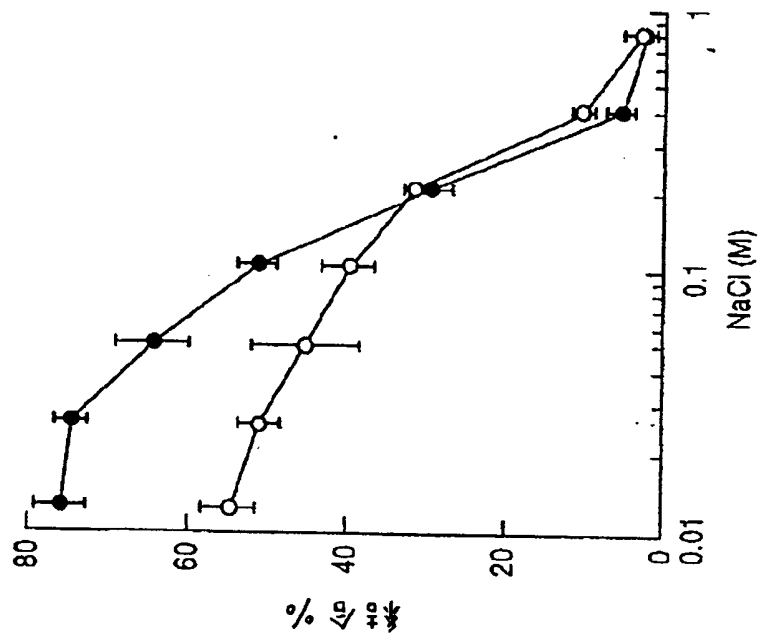


FIG. 2

【 図 3 】

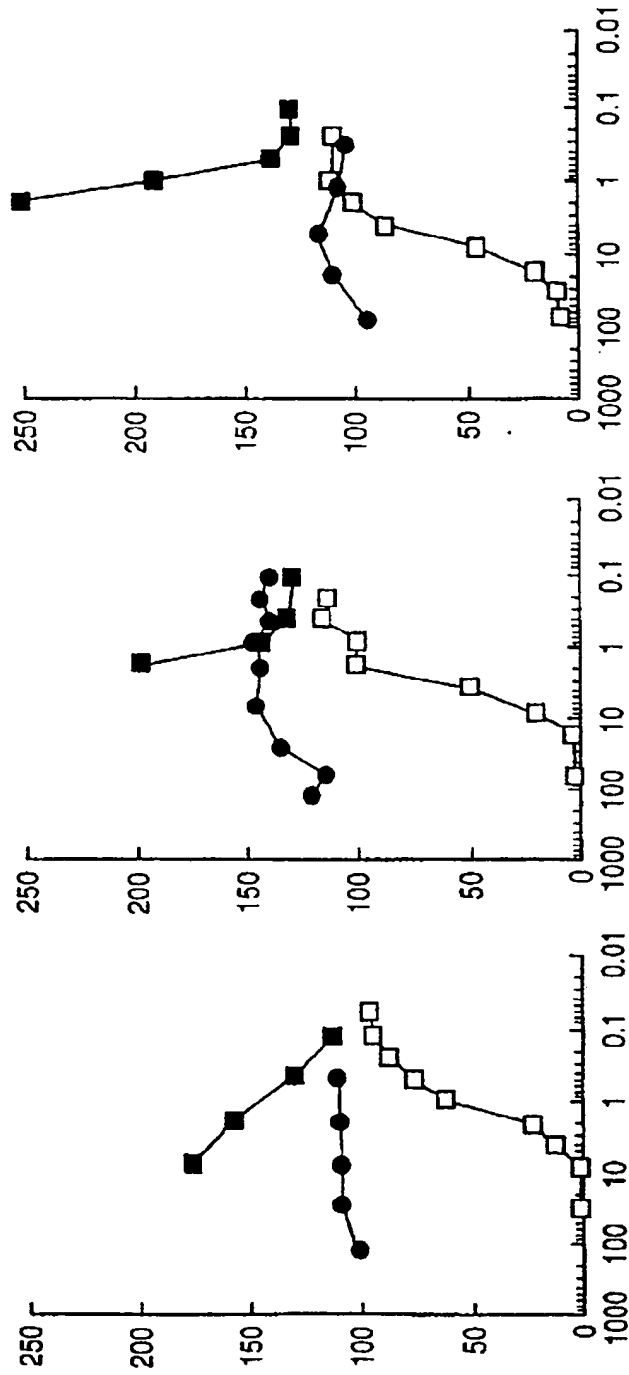


FIG. 3

【 図 4 】

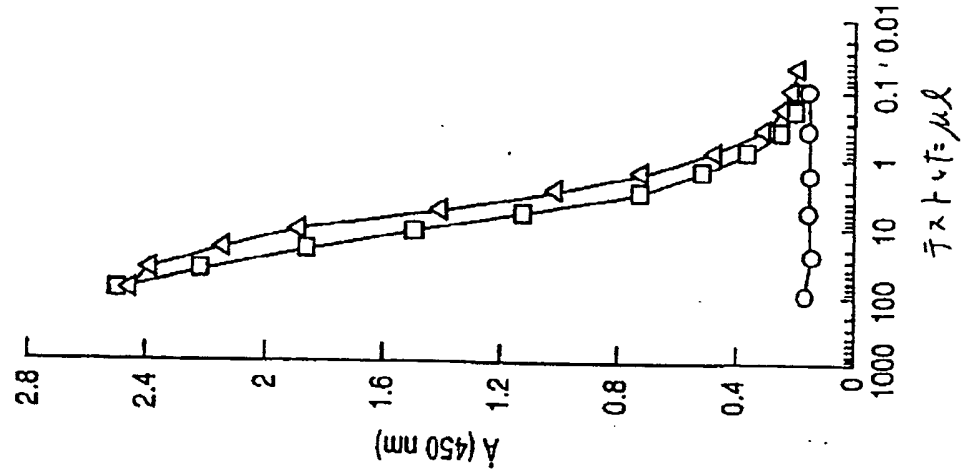


FIG. 4C

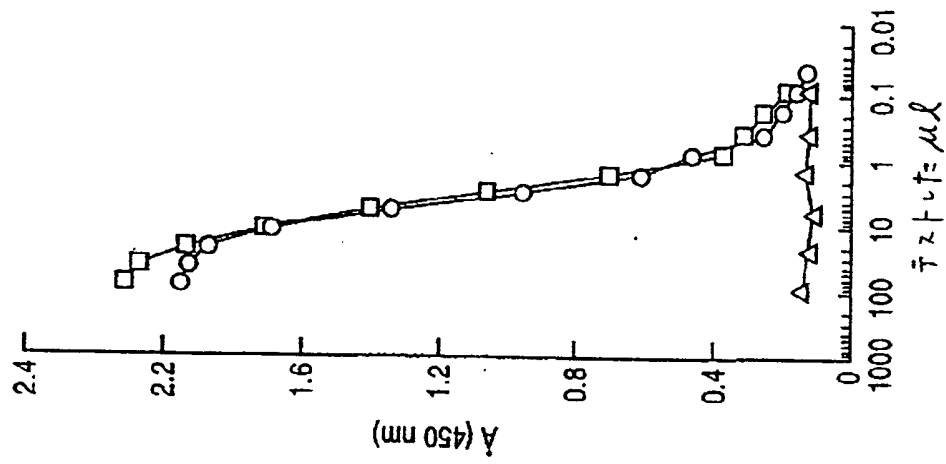


FIG. 4B

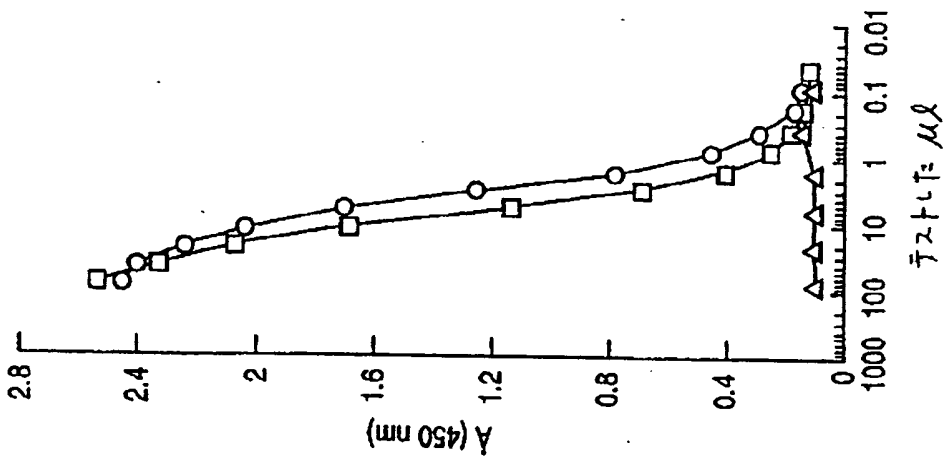


FIG. 4A

【 図 5 】

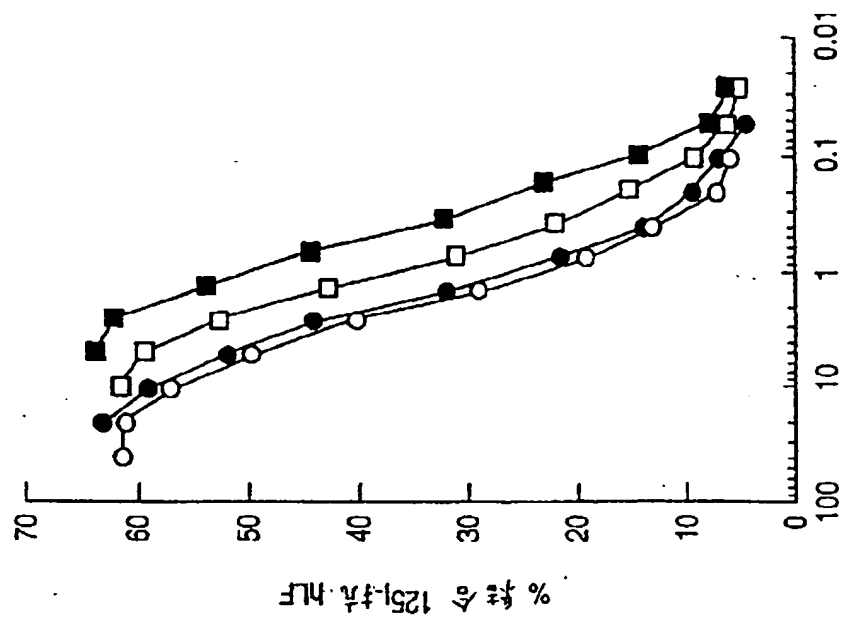


FIG. 5B

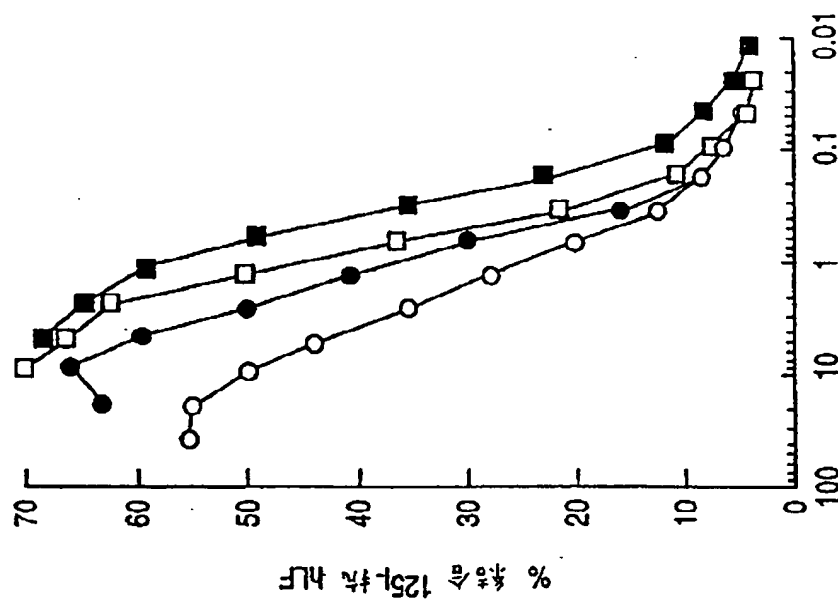


FIG. 5A

【 図 6 】

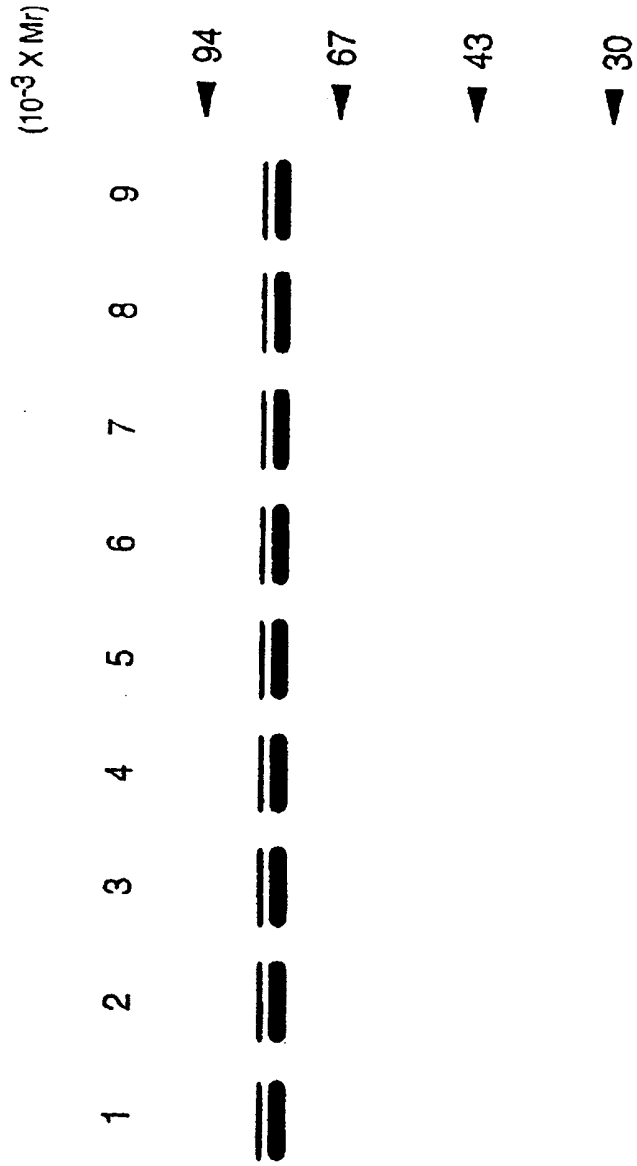


FIG. 6

【 図 7 】

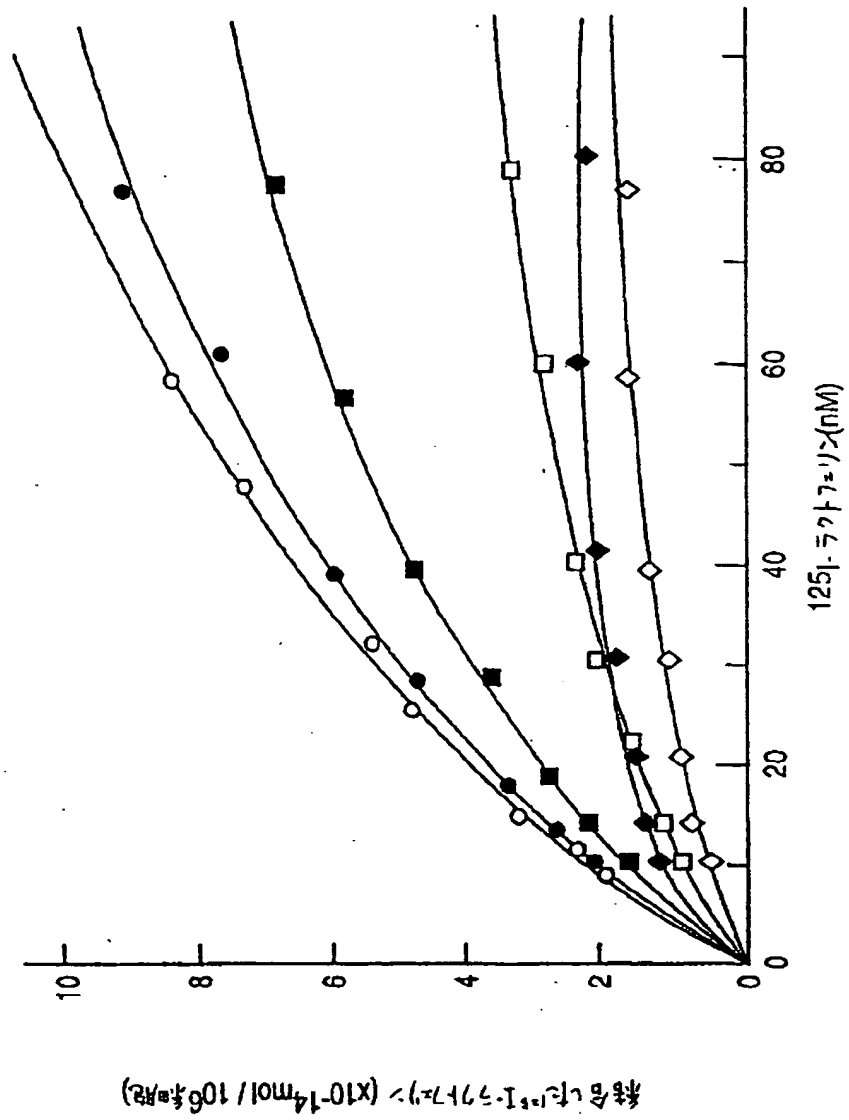


FIG. 7

【 図 8 】

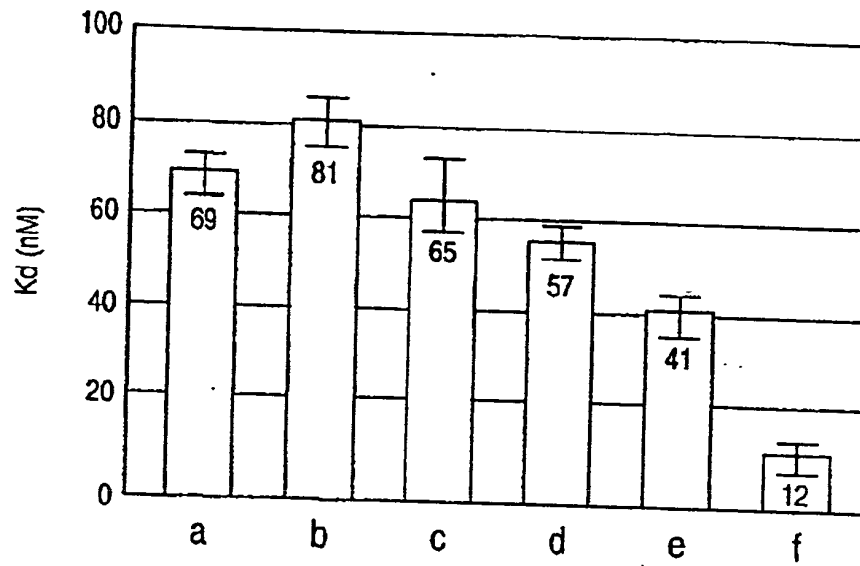


FIG. 8A

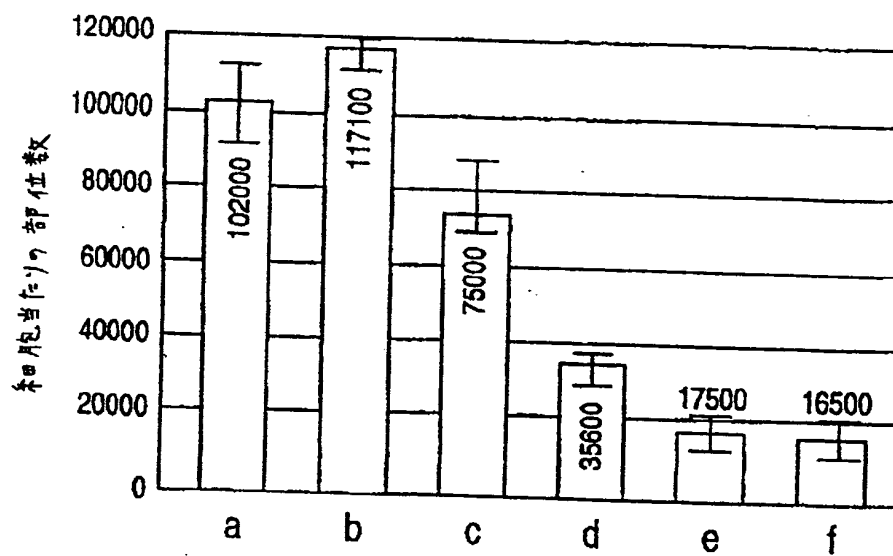


FIG. 8B

【 図 9 】

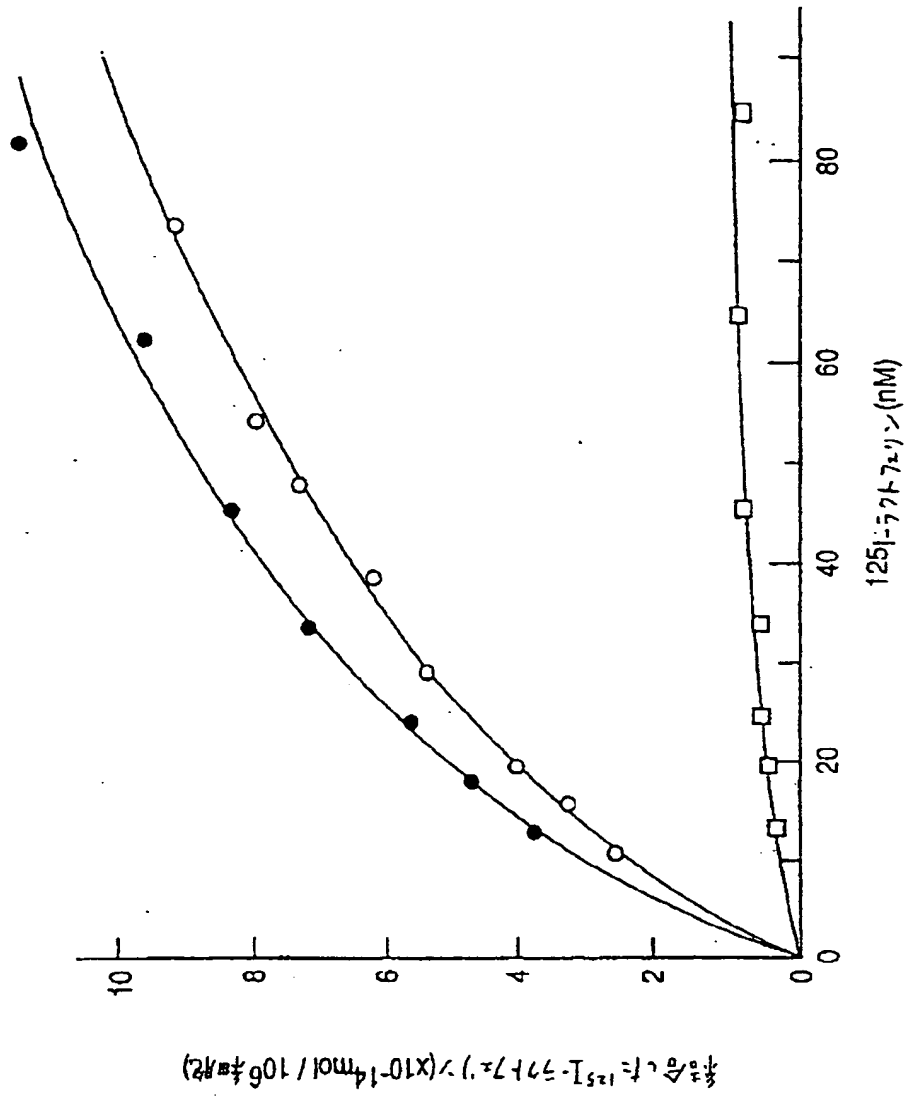


FIG. 9

【 図 1 0 】

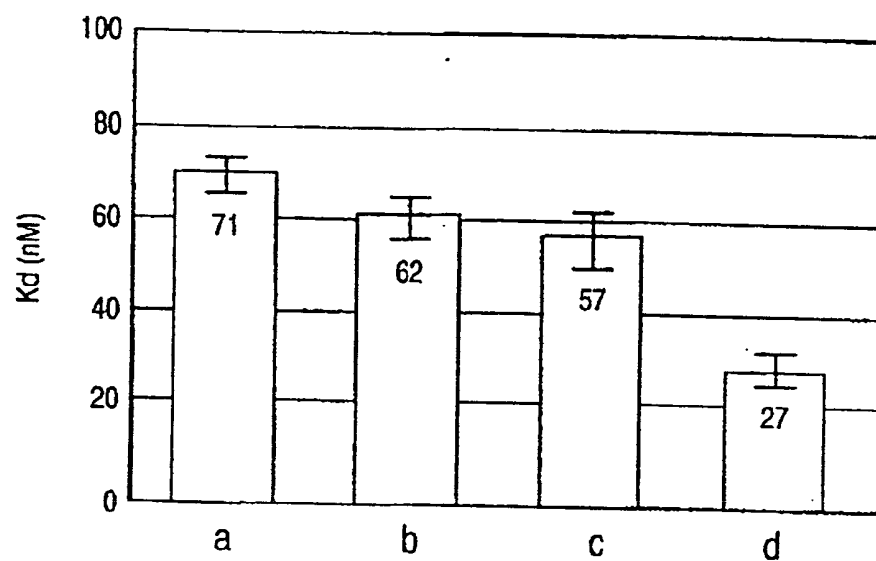


FIG. 10A.

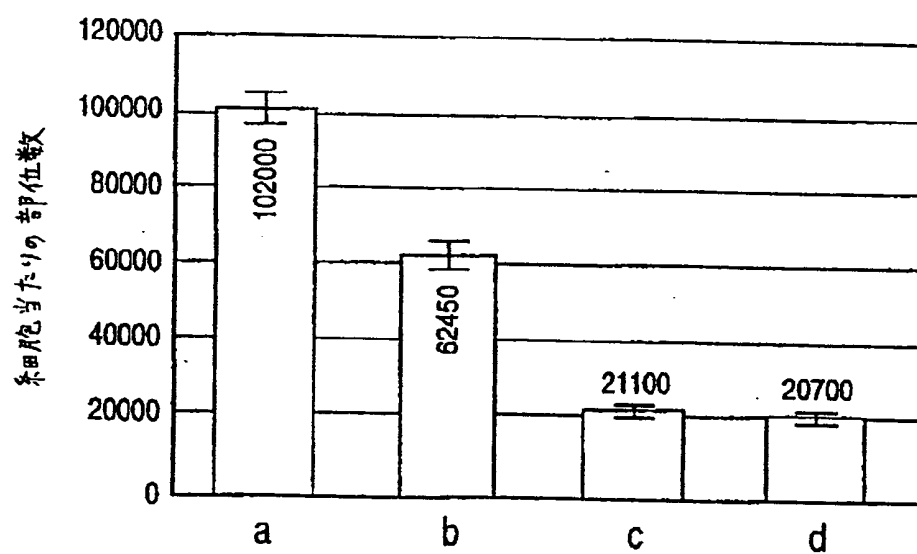


FIG. 10B

【 図 1 1 】

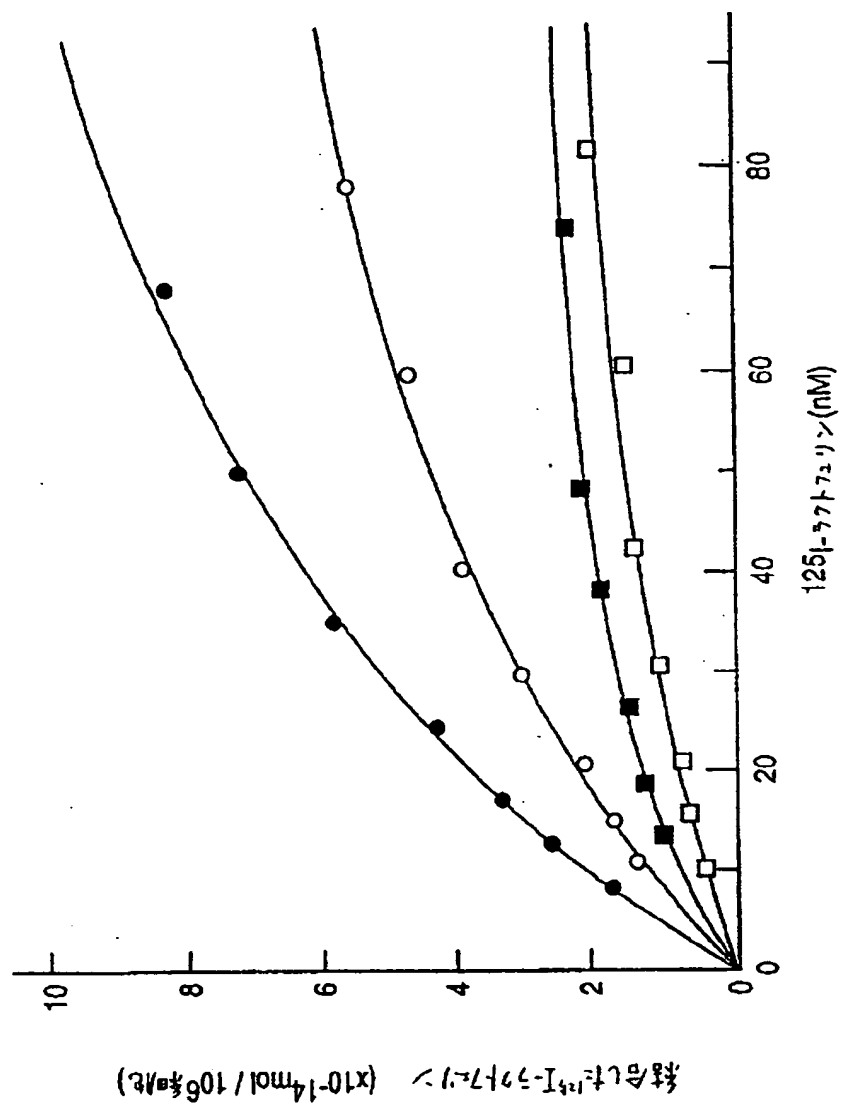


FIG. 11

【 図 1 2 】

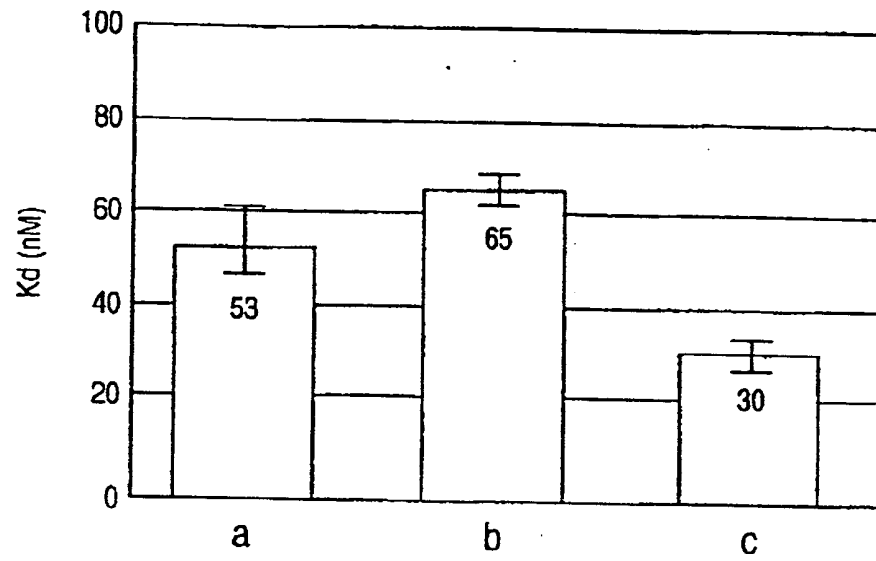


FIG. 12A

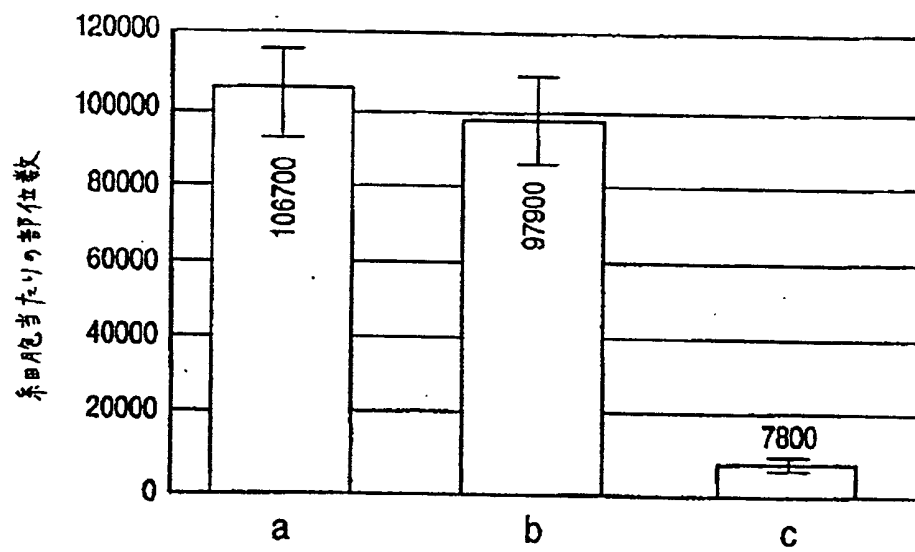


FIG. 12B

【 13 】

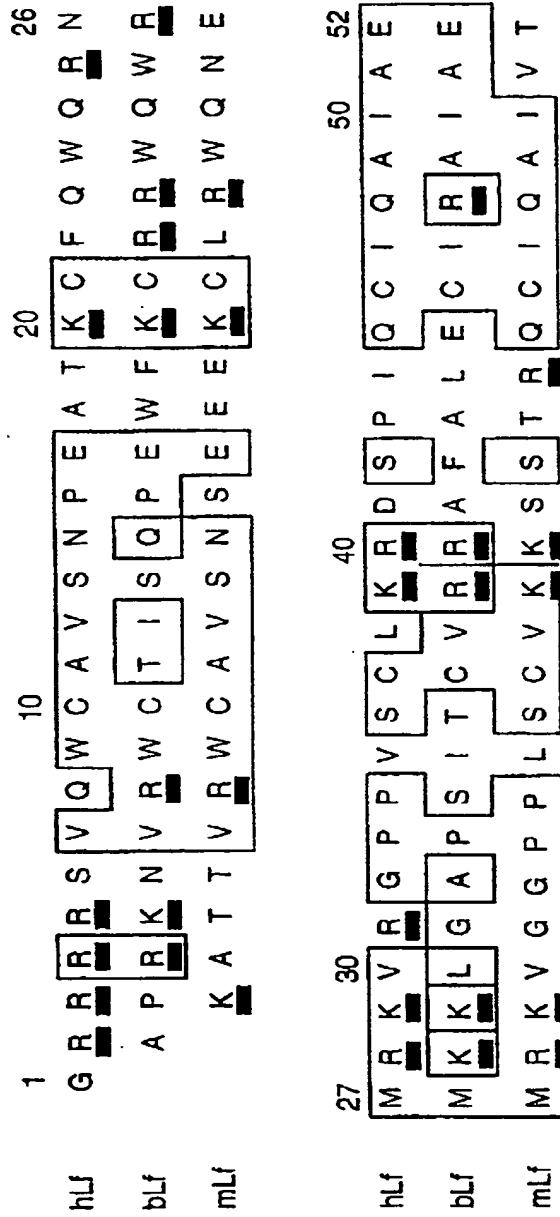


FIG. 13

【 図 1 4 】

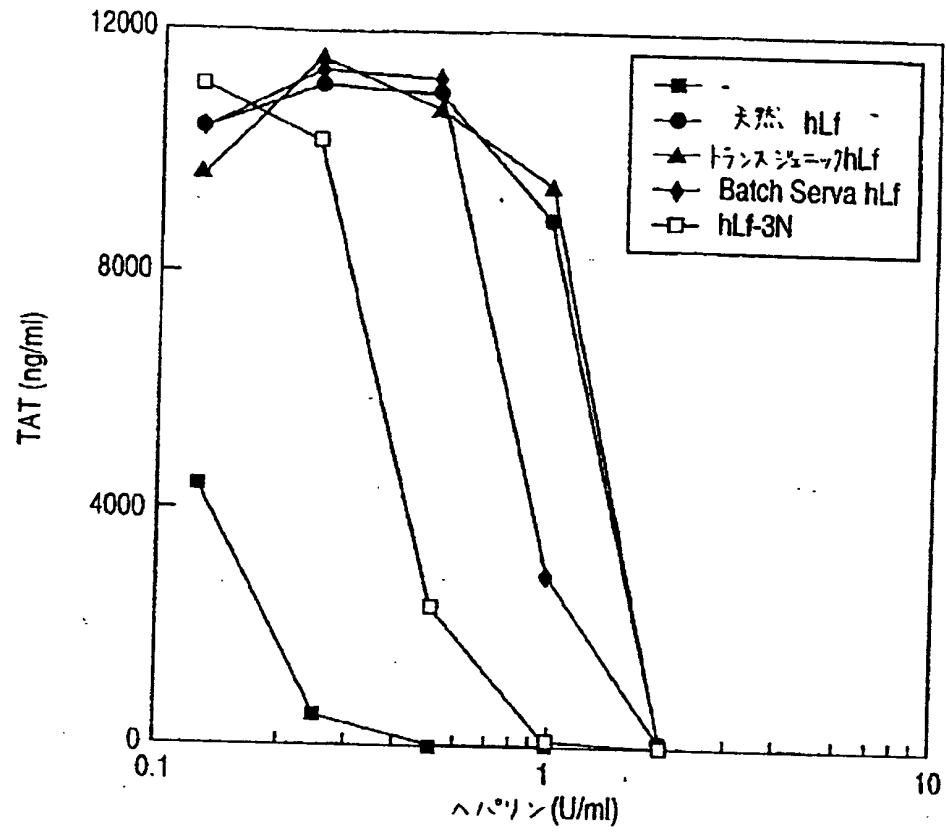


FIG. 14

【 図 16 】

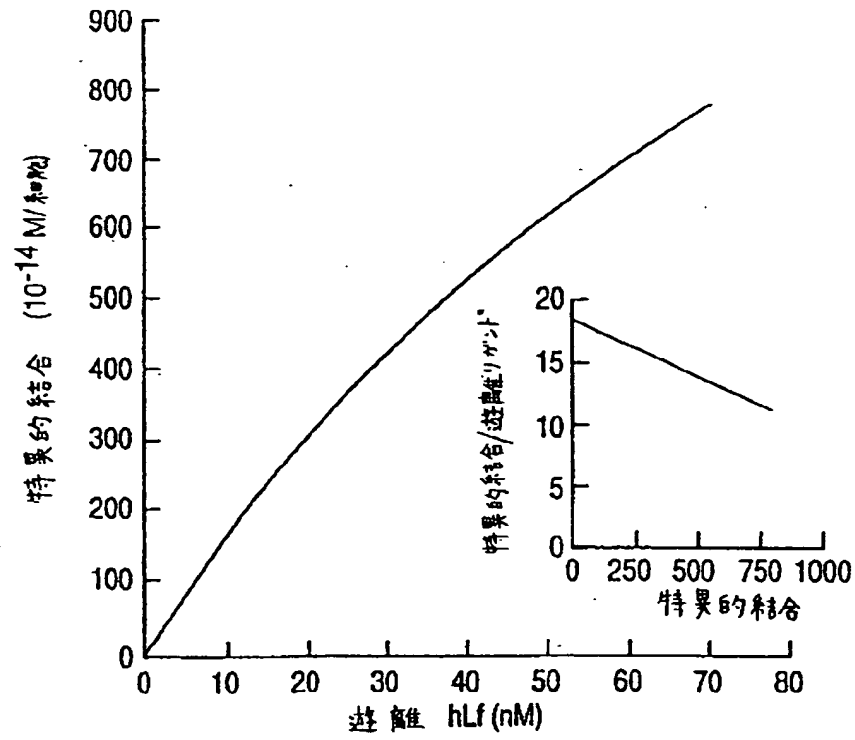


FIG. 16

【 図 1 5 】

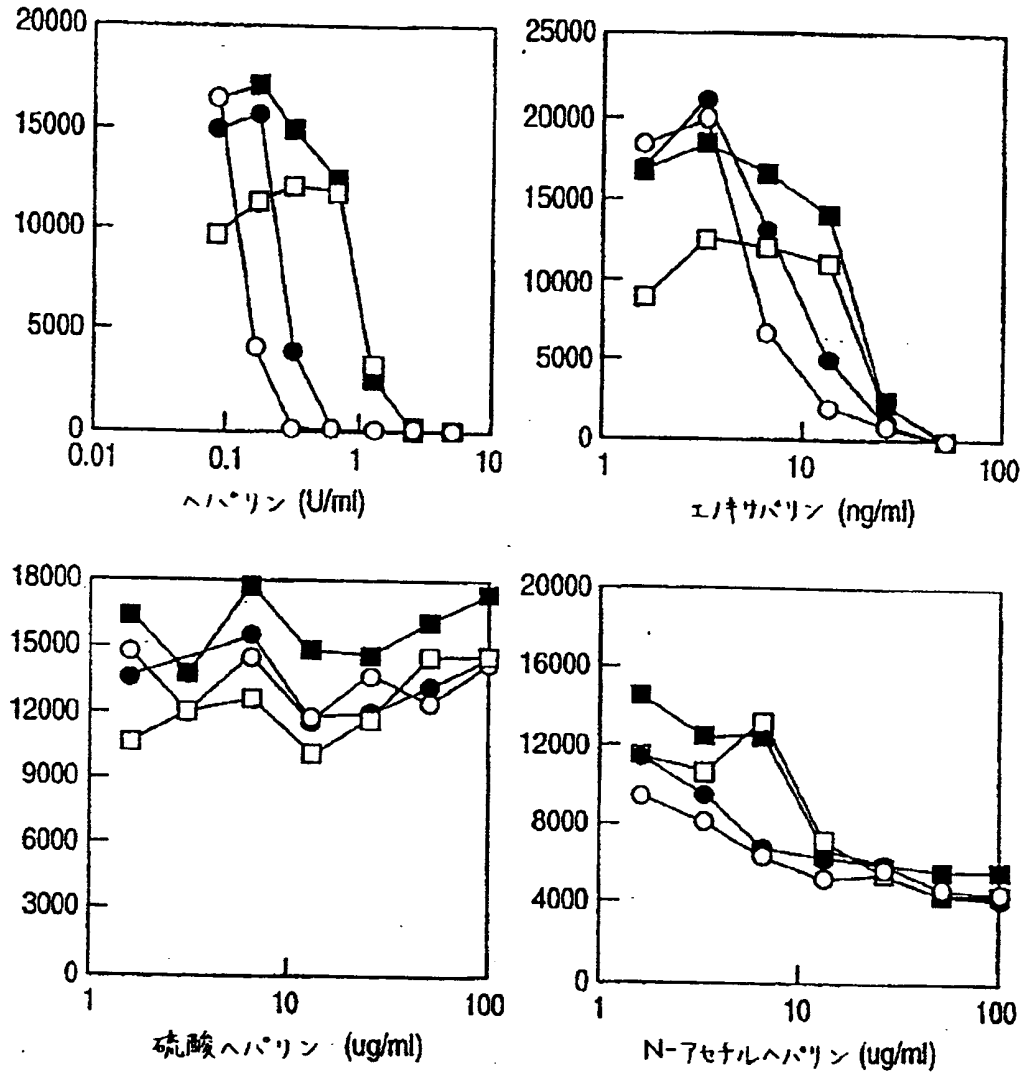


FIG. 15

【 図 1 7 】

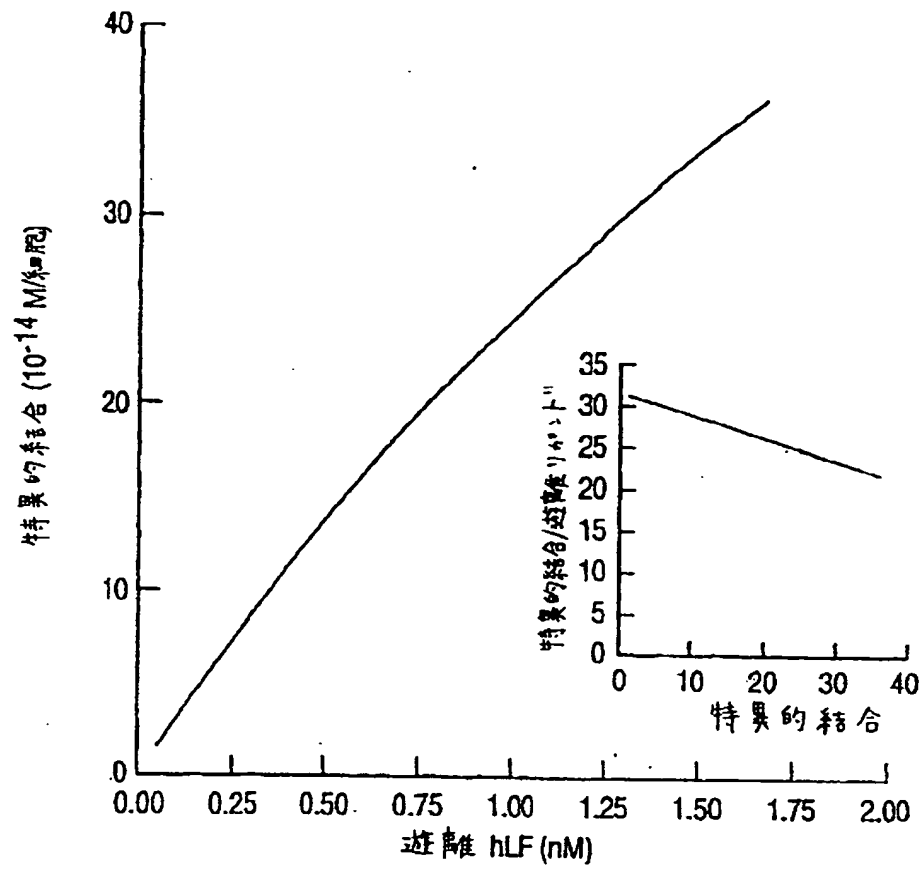


FIG. 17

【 図 1 8 】

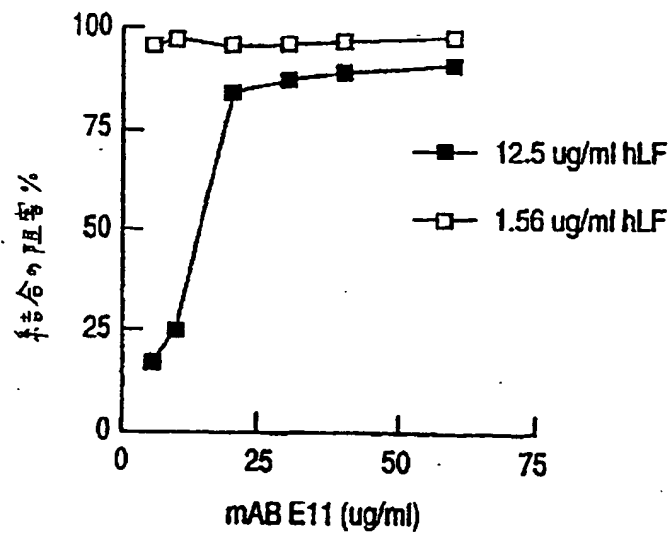


FIG. 18

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K14/79 A61K38/40		Intern. Appl. Application No PCT/IB 98/00441
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MANN, D.M. ET AL.: "Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin" J. BIOL. CHEM., vol. 269, no. 38, 1994, pages 23661-23667, XP002072083 * abstract; p. 23665: "Discussion" *	2.3
Y	WO 93 22348 A (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 11 November 1993 * figs. 4 and 6; page 1, line 15 - p. 2, l. 2; p. 2, l. 17 - p. 3, l. 19 *	2,3,36, 37
A	WO 92 21752 A (UNITED STATES OF AMERICA) 10 December 1992 * page 13; claim 10 *	2,3
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 July 1998		Date of mailing of the international search report 15.01.99
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 MV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer HERMANN R.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 98/00441

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 584 558 A (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.) 2 March 1994 * page 2, lines 43-47; example 2; experimental examples; claim 4 *	36, 37
P, X	WO 97 45136 A (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 4 December 1997 * page 10, lines 8-14 *	2, 3
P, X	VAN BERKEL, P.H.C. ET AL.: "N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin ..." BIOCHEM. J., vol. 328, 15 November 1997, pages 145-151, XP002072084 * whole disclosure, esp. p. 146: "Isolation of N-terminally truncated natural hLF" *	2, 3
P, X	LEGRAND, D. ET AL.: "The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin ..." BIOCHEM. J., vol. 327, 1 November 1997, pages 841-846, XP002072085 * abstract; tab. 2 *	2, 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/IB 98/00441

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9322348 A	11-11-1993	AU 681583 B	04-09-1997
		AU 4289293 A	29-11-1993
		BR 9306289 A	30-06-1998
		CA 2134094 A	11-11-1993
		CN 1079780 A	22-12-1993
		EP 0644899 A	29-03-1995
		JP 2824332 B	11-11-1998
		JP 8504561 T	21-05-1996
		NZ 252844 A	28-05-1996
		SG 47605 A	17-04-1998
		US 5571691 A	05-11-1996
		US 5571896 A	05-11-1996
		US 5571697 A	05-11-1996
		US 5766939 A	16-06-1998
		US 5849881 A	15-12-1998
		ZA 9302568 A	12-11-1993
WO 9221752 A	10-12-1992	AU 2029192 A	08-01-1993
		EP 0603187 A	29-06-1994
EP 584558 A	02-03-1994	JP 6048956 A	22-02-1994
		US 5725864 A	10-03-1998
WO 9745136 A	04-12-1997	AU 3227197 A	05-01-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/12		A 6 1 P 31/18	
31/18		35/00	
35/00		37/06	
37/06		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	C 0 7 K 14/79	
C 0 7 K 14/79		C 1 2 N 7/04	
C 1 2 N 7/04		C 1 2 Q 1/02	
15/09	Z N A	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 Q 1/02		A 6 1 K 37/14	
// C 0 7 K 16/18		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, M W, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, E S, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, I D, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, M G, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, S L, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, V N, YU, ZW		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)